

## 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 избранной темы

С точки зрения фундаментальной и прикладной науки ключевой актуальной проблемой является изучение процессов, происходящих в живых системах и разработка методов для их визуализации. Действительно, визуализация активности нейронов согласно изменениям мембранного потенциала дает возможность изучения работы мозга. Также визуализация изменений потенциала мембраны клеток открывает возможность для изучения онкологии и процессов старения, а также разработки методов скрининга препаратов для лечения перечисленных заболеваний. Создание и понимание функционирования флуоресцентных индикаторов мембранного потенциала также облегчает разработку новых индикаторов на другие типы молекул. Таким образом, диссертационная работа Кост Л.А. вносит существенный вклад в развитие этой актуальной темы.

### Научная новизна исследования

Работа Кост Л.А. посвящена разработке и характеристике генетически-кодируемых индикаторов мембранного потенциала. Оригинальность и новизна данной диссертационной работы обусловлена тем, что автор предложил несколько альтернативных подходов для создания индикаторов мембранного потенциала. Впервые был получен функциональный бимолекулярный вариант красного флуоресцентного белка FusionRed с разрывом между остатками 188 и 189, FR198-188. Впервые были разработаны индикаторы мембранного потенциала на основе бимолекулярного варианта красного белка FusionRed и потенциал-чувствительного домена из фосфатазы асцидий *Ciona intestinalis*, VSD-FR-189-188 и серия VSD2-5, имеющие новую топологию со "вставкой в циркулярный пермутант флуоресцентного белка". Впервые автор обнаружил альтернативный способ изменения полярности индикатора и других его свойств, потенциально применимый к широкому диапазону индикаторов. Впервые автор провел оптимизацию флуоресцентного домена индикатора FusionRed на основе изучения его кристаллической структуры. Автор впервые обнаружил, что нарушение циклизации трипептида хромофора не препятствует его дальнейшим превращениям, тем самым внося важный вклад в понимание пост-трансляционной модификации GFP-подобных белков. И,

наконец, автор впервые успешно использовал электроподвижный белок из млекопитающих, престин, для разработки функционального варианта индикатора мембранного потенциала, Prestin-5. Таким образом, полученные новые индикаторы мембранного потенциала и предлагаемые в работе подходы для их создания и закономерности открывают возможность для их дальнейшего использования в других лабораториях для регистрации активности нейронов, а также для разработки индикаторов не только на мембранный потенциал, но и на различные молекулы.

Структура и содержание работы, степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, их достоверность и новизна

Работа изложена на 101 странице, включая страницы со списком цитированной литературы и двумя приложениями, включает 33 рисунки и 8 таблиц. Диссертация содержит следующие стандартные разделы: «Оглавление», «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список цитированной литературы», а также дополнительный раздел «Приложения».

В разделе «Введение» обоснована актуальность темы исследования, степень разработанности проблемы, сформулированы цели и задачи исследования, обозначены предмет и объект исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость результатов.

«Обзор литературы» включает данные о современном состоянии исследований в области регистрации мембранного потенциала и способов их измерения с акцентом на генетически-кодируемые флуоресцентные индикаторы.

В целом, «Обзор литературы» написан ясно, хорошим научным языком, широко охватывает материал, и дает полное представление о проблемах и задачах в данной области исследования.

Глава «Материалы и методы» подробно описывает стандартные процедуры, использованные при проведении исследований. Автор демонстрирует использование большого арсенала современных методов молекулярной и клеточной биологии, таких как: стандартное молекулярное клонирование, случайный ПЦР-мутагенез, метод модульного клонирования "Golden Gate", секвенирование ДНК, выделение и очистка белков из бактериальных культур, характеристика спектральных и физико-химических характеристик флуоресцентных белков, трансфекция животных клеток, флуоресцентная микроскопия. Кроме того, стоит отметить использование автором метода локальной фиксации потенциала. Методический уровень диссертации, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Раздел «Результаты и их обсуждение» состоит из шести частей и содержит основные результаты работы. На первом этапе были получены циркулярно-пермутированные варианты красного флуоресцентного белка FusionRed.

Затем на основе найденных ранее бимолекулярных вариантов белка FusionRed и потенциал-чувствительного домена из фосфатазы асцидий *Ciona intestinalis* были сконструированы два варианта индикатора на потенциал действия, имеющие новую топологию, а именно "вставку в циркулярный пермутант флуоресцентного белка".

На следующем этапе работы для разработанного индикатора VSD-FR189-188 была проведена оптимизация длины линкера между флуоресцентным и потенциал-чувствительным доменами. Был обнаружен альтернативный способ изменения полярности индикатора и других его свойств, потенциально применимый к широкому диапазону индикаторов.

Далее была проведена оптимизация флуоресцентного домена индикатора. Для этого была получена кристаллическая структура белка FusionRed и на ее основе были получены варианты FusionRed с улучшенной яркостью за счет блокировки расщепления пептидного остова FusionRed. Таким образом, автор внес важный вклад в понимание пост-трансляционной модификации GFP-подобных белков и сделал важный вывод о том, что нарушение циклизации три-пептида хромофора не препятствует его дальнейшим превращениям.

И наконец, на последнем этапе работы Кост Л.А. на основе красного флуоресцентного белка FusionRed и электроподвижного белка из млекопитающих престина, разработала различные топологические варианты индикаторов мембранного потенциала и охарактеризовала их свойства. Таким образом, автору удалось разработать индикатор мембранного потенциала на основе красного флуоресцентного белка и престина, и был сделан вывод о нелинейном характере между свойствами индикатора и длиной линкеров.

Текст сопровождается 122 ссылками, большая часть которых относится к работам последнего десятилетия, в том числе 2021 года.

Диссертационная работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». Все научные положения, заключения и выводы достоверны, обоснованы, новы и полностью отражают полученные научные результаты.

Автореферат соответствует содержанию диссертации, а сама диссертационная работа полностью отражена в четырех научных статьях, опубликованных автором в российском (Биоорганическая химия с импакт-фактором 1.354) и зарубежных журналах (International Journal of Biological Macromolecules, Biosensors и PLOS One с импакт-

факторами 6.953 и 3.576, и 3.24, соответственно) с высокими импакт-факторами, результаты исследования доложены на пяти отечественных и международных конференциях.

В целом, работа выполнена на самом высоком научном уровне, но вместе с тем есть ряд незначительных замечаний к представленной работе:

Отмечу, что в диссертации присутствуют опечатки и орфографические ошибки, которые не относятся к научной сути работы.

Замечания к работе:

- 1) Введение, стр. 4. Не ясно, что имелось ввиду под "высоким пространственным разрешением". Возможно, высокая яркость или локализация на мембране?
- 2) Материалы и методы, стр. 37. Не описано, чем элюировали белок после связывания с носителем Talon.
- 3) Результаты и обсуждение, стр. 45. Упомянется вариант сrFP76-73, содержащий мутацию R126I, найденную во время случайного мутагенеза. Однако в тексте не описывается, что проводилась оптимизация пермутантов FusionRed, нет информации о том, сколько было проведено раундов мутагенеза и для каких пермутантов.

#### Заключение о соответствии диссертации критериям, установленным требованиям

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертационная работа Кост Любови Александровны "Разработка индикатора мембранного потенциала на основе красного флуоресцентного белка FusionRed" соответствует всем 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:

кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник лаборатории нейронаук  
Курчатовского комплекса нано-, био-, информационных  
и когнитивных наук и природоподобных технологий  
Федерального государственного бюджетного  
учреждения Национального исследовательского центра  
"Курчатовского института"

Субач Федор Васильевич

*Субач*

/Ф.В. Субач/

02 марта 2022 г.

Контактные данные:

Тел.: +7 (968)9627083, e-mail: subach\_fv@nrcki.ru

Адрес места работы:

123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д. 1

