

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 06.04.2022 г. № 9

О присуждении **Кост Любови Александровне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Разработка индикатора мембранного потенциала на основе красного флуоресцентного белка FusionRed» по специальности 1.5.3 - молекулярная биология принята к защите 27.01.2022 (протокол заседания № 1) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН), (адрес: 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10; действует на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и № 561 от 03.06.2021).

Соискатель Кост Любовь Александровна, 07 мая 1991 года рождения, в 2014 году окончила Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова по специальности "медицинская биофизика". В 2021 г. закончила аспирантуру Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук

Диссертация выполнена в лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Научный руководитель – кандидат биологических наук Богданов Алексей Михайлович, старший научный сотрудник лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Сурин Александр Михайлович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории фундаментальных и прикладных проблем боли «Научно-исследовательского института общей патологии и патофизиологии», заведующий

лабораторией нейробиологии и основ развития мозга ФГАУ «НМИЦ здоровья детей» Минздрава России;

Субач Федор Васильевич, кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории нейронаук Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН), г. Москва, в своем *положительном* отзыве, подписанном руководителем группы молекулярного моделирования д.ф.-м.н. Хреновой Марией Григорьевной, и утверждённом директором ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН д.б.н. Федоровым Алексеем Николаевичем, указала, что диссертационная работа Кост Любови Александровны «Разработка индикатора мембранного потенциала на основе красного флуоресцентного белка FusionRed» соответствует требованиям, 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; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 № 1539), а Любовь Александровна Кост заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Соискатель имеет 5 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 4 работы общим объемом 3 печ.л, в рецензируемых журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Кост Л.А. внесла основной и существенный вклад:

Kost, L.A., E.V. Putintseva, A.R. Pereverzeva, D.M. Chudakov, K.A. Lukyanov, and A.M. Bogdanov. 2016. “Bimolecular Fluorescence Complementation Based on the Red Fluorescent Protein FusionRed.” *Russian Journal of Bioorganic Chemistry* 42 (6). doi:10.1134/S1068162016060054.

Kost, L.A., E.S. Nikitin, V.O. Ivanova, U. Sung, E.V. Putintseva, D.M. Chudakov, P.M. Balaban, K.A. Lukyanov, and A.M. Bogdanov. 2017. “Insertion of the Voltage-Sensitive Domain into Circularly Permuted Red Fluorescent Protein as a Design for Genetically Encoded Voltage Sensor.” *PLoS ONE* 12 (9). doi:10.1371/journal.pone.0184225.

Kost, L.A., V.O. Ivanova, P.M. Balaban, K.A. Lukyanov, E.S. Nikitin, and A.M. Bogdanov. 2019. “Red Fluorescent Genetically Encoded Voltage Indicators with Millisecond Responsiveness.” *Sensors* 19 (13): 2982. doi:10.3390/s19132982.

Muslinkina, L., V.Z. Pletnev, N.V. Pletneva, D.A. Ruchkin, D.V. Kolesov, A.M. Bogdanov, L.A. Kost, et al. 2020. “Two Independent Routes of Post-Translational Chemistry in Fluorescent Protein FusionRed.” *International Journal of Biological Macromolecules* 155 (July): 551–59. doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.03.244.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.б.н. Сурина Александра Михайловича. Отзыв положительный, содержит 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 линии 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 окрыжен 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*.

Отзыв официального оппонента к.б.н. Субача Федора Васильевича. Отзыв положительный, содержит замечания:

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. Упоминается вариант srFP76-73, 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.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит замечания:

1. Рекомендуются произвести измерения квантовых выходов флуоресценции вариантов индикатора VSD-FR189-188 и попытаться построить модель, связанную с цис-транс изомеризацией хромофора при изменении длины междоменного линкера.

2. Требуется комментарий вопрос о возможности возникновения нежелательных перекрестных взаимодействиях при использовании индикаторов на основе белка престина в клетках млекопитающих. Насколько престин генетически далек от белкового аппарата клеток млекопитающих и прежде всего человека, и не будет ли его использование затруднено, как это происходило при разработке кальциевых сенсоров на основе фрагмента M13?

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы: генетически-

кодируемые флуоресцентные инструменты, флуоресцентная микроскопия, анализ физиологических процессов, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих научных международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают большим опытом исследовательской и экспертной работы и высокой квалификацией, которые позволяют им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований был создан набор пермутированных и бимолекулярных вариантов красного флуоресцентного белка FusionRed. Идентифицированы структурные детерминанты частичного расщепления полипептидной цепи FusionRed в области хромофора. На основе этих данных созданы варианты FusionRed, в которых не происходит посттрансляционный протеолиз, в том числе обладающие увеличенной яркостью флуоресценции. Разработан индикатор VSD-FR189-188, реализующий новую для ГКИМП молекулярную архитектуру «insertion into cpFP». Тем самым продемонстрирована принципиальная применимость этой молекулярной архитектуры для разработки индикаторов мембранного потенциала. Показано, что модификация длины междоменного линкера может приводить к существенному изменению кинетических характеристик индикатора VSD-FR189-188 и смене «полярности» ($\Delta F/\Delta V$) его флуоресцентного ответа. А также был впервые применен электроподвижный белок млекопитающих престин в роли потенциал-чувствительного домена генетически кодируемого индикатора мембранного потенциала.

Теоретическая значимость исследования состоит в углублении понимания механизмов, лежащих в основе функционирования химерных белковых молекул генетически кодируемых индикаторов мембранного потенциала. Также обнаружен феномен смены полярности флуоресцентного ответа индикаторов при изменении длины междоменных линкерных последовательностей, что может быть использовано при разработке широкого спектра индикаторов на основе флуоресцентных белков и изучения физико-химических свойств данных химерных молекул

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что создан индикатор мембранного потенциала VSD-FR189-188, реализующий новый дизайн архитектуры химерной белковой молекулы ГКИМП. На основе VSD-FR189-188 получены варианты индикаторов с субмиллисекундной кинетикой, применимые для регистрации быстрых нейрональных событий. Помимо этого, использование белка престина в качестве потенциал-чувствительного домена индикатора обогащает арсенал белковых доменов для дальнейшей разработки индикаторов мембранного потенциала. Также, успешная экспрессия полученных вариантов ГКИМП в

нейронах млекопитающих демонстрирует применимость данных молекулярных инструментов и их производных для решения фундаментальных и прикладных задач нейробиологии.

Оценка достоверности результатов исследования сомнений не вызывает и выявила, что использование описанных методик обосновано, работа выполнена на сертифицированном оборудовании, показана воспроизводимость результатов исследования. Данные получены в независимых экспериментах в необходимом объеме. Также проведено сравнение авторских данных с ранее опубликованными по тематике данными, выявлены сходства и различия, они обсуждены в тексте, даны необходимые объяснения и обоснования.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, литературном поиске, сборе данных, разработке новых экспериментальных методик и интерпретации полученных результатов. А также в налаживании коллабораций, апробации результатов исследования на российских и международных конференциях, подготовке публикаций. Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем или при его непосредственном участии, за исключением электрофизиологической части экспериментов, проводимых в сотрудничестве с Лабораторией нейробиологии обучения ИВНД РАН (Россия, Москва) и Center for Functional Connectomics, Korea Institute of Science & Technology (Seoul, Korea).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

1. Выбирались пермутанты рационально или был какой-то комбинаторный или machine learning процесс? Потому что было необходимо несколько параметров учитывать?
2. Вопрос, насколько сенсор воспроизводимо измеряет потенциал? Если провести много измерений на протяжении одного дня, разных дней, как в этом плане?
3. Когда делали десятки мутантов, то видели, что часть работает, часть нет. Как-то анализировались полученные результаты? Также было сказано, что получен индикатор, который не уступает лучшим из имеющихся, но вот насколько удалось подойти к созданию идеального индикатора, возможно ли это в принципе, и есть ли какие-то дальнейшие пути движения в этом направлении?

Соискатель Кост Л.А. ответила на задаваемые ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

1. В работе сочетались оба подхода, разрабатывались варианты на основе ранее полученных данных о кристаллической структуре белков mCherry и mKate2 и их пермутированных вариантов, но также в задаче создания пермутированных вариантов некоторый элемент перебора безусловно тоже есть.

2. Считалось положительным наличие сигнала индикатора только при условии, что он достоверно воспроизводится. Серии экспериментов проводились как в одной культуре в разное время, так и на нескольких культурах клеток.
3. Относительно наблюдений и выводов из работы с пермутированными вариантами можно сказать, что наблюдались различные варианты на основе петельных локализаций разрыва и на основе пермутантов с разрывом непосредственно вблизи хромофорной группы, и из этого делали выводы. Также, когда наблюдали динамику улучшения или ухудшения свойств результирующего белка, то попробовали соседнюю точку и наблюдали динамику, исходя из которой двигались дальше. Огромный вклад вносят ранее проведенные исследования на основе красных флуоресцентных белков, однако часто мы также наблюдаем, что предыдущий опыт оказывается нерепрезентативным для нашего белка. Относительно нашего индикатора, его характеристики с точки зрения кинетики ставят его в один ряд с наиболее быстрыми из существующих индикаторов. Однако совокупность его характеристик пока недостаточна для того, чтобы можно было утверждать, что нам удалось создать в целом идеальный индикатор. Но видны различные пути улучшения, которые надеемся осуществить, и я верю, что однажды будет создан такой инструмент.

Исходя из вышеизложенного, диссертационный совет заключает, что диссертация Кост Л.А. написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты и является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой вносят важный вклад в развитие исследований в областях молекулярной биологии, нейробиологии и медицины. Таким образом, диссертационная работа Кост Любови Александровны ««Разработка индикатора мембранного потенциала на основе красного флуоресцентного белка FusionRed»», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 №842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. №335; 02.08.2016 г. №748; от 29.05.2017 г. №650; от 20.03.2021 г. №426; от 11.09.2021 г. №1539).

На заседании 6 апреля 2022 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по разработке индикатора мембранного потенциала на основе красного флуоресцентного белка FusionRed, имеющей важное значение для исследований в области молекулярной биологии и нейробиологии, присудить Кост Любови Александровне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 25 человек, из них 8 докторов наук (по научной специальности рассматриваемой


диссертации 1.5.3 - Молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 25, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель
диссертационного совета
академик РАН




Иванов Вадим Тихонович

Ученый секретарь
диссертационного совета
д.ф.-м.н.


Олейников Владимир Александрович

7 апреля 2022 г.