

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
Институт биоорганической химии  
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова  
Российской академии наук

## СТЕНОГРАММА

Заседание Диссертационного совета 24.1.037.01  
6 апреля 2022 года

Защита диссертации на соискание ученой степени  
кандидата биологических наук

**Кост Любовь Александровна**

По теме: **«Разработка индикатора мембранного потенциала на основе  
красного флуоресцентного белка FusionRed»**

Специальность 1.5.3 – «молекулярная биология»

Москва - 2022

## СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 6 апреля 2022 года

Председатель  
диссертационного совета д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

Учёный секретарь  
диссертационного совета д.ф.-м.н. Олейников В.А.

Из 30 членов совета присутствует 25 человек, из них докторов по профилю диссертации – 8.

1.	Академик РАН, д.х.н.	Иванов Вадим Тихонович	(1.4.9)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(1.4.9)
3.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Липкин Валерий Михайлович	(1.5.6)
4.	Д.физ.-мат.н.	Олейников Владимир Александрович	(1.5.6)
5.	Д.б.н.	Ажикина Татьяна Леодоровна	(1.5.3)
6.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(1.5.6)
7.	Д.х.н.	Белогуров Алексей Анатольевич	(1.5.3)
8.	Д.х.н.	Бовин Николай Владимирович	(1.5.6)
9.	Академик РАН, д.х.н.	Габибов Александр Габибович	(1.5.6)
10.	Академик РАН, д.б.н.	Деев Сергей Михайлович	(1.5.3)
11.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(1.4.9)
12.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(1.5.3)
13.	Академик РАН, д.х.н.	Донцова Ольга Анатольевна	(1.5.3)
14.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Завриев Сергей Кириакович	(1.5.6)
15.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(1.5.6)
16.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(1.5.3)
17.	Академик РАН, д.б.н.	Лукьянов Сергей Анатольевич	(1.5.3)
18.	Академик РАН, д.х.н.	Мирошников Анатолий Иванович	(1.5.6)
19.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(1.4.9)
20.	Д.б.н.	Сапожников Александр Михайлович	(1.5.3)
21.	Д.х.н.	Смирнов Иван Витальевич	(1.4.9)
22.	Член-корр. РАН, д.б.н.	Тоневицкий Александр Григорьевич	(1.5.6)
23.	Член-корр. РАН, д.х.н.	Цетлин Виктор Ионович	(1.4.9)
24.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(1.4.9)
25.	Д.х.н.	Ямпольский Илья Викторович	(1.4.9)

**Иванов В.Т., председатель:** Защита Любови Александровны Кост. Наверно нужно заслушать материалы личного дела, да?

**Олейников В.А., учёный секретарь:** Конечно. *(Зачитывает материалы из аттестационного дела Кост Любови Александровны)*

**Кост Л.А., соискатель:** *(излагает основные положения диссертационной работы)*

*(Далее задают вопросы к соискателю по докладу).*

**Габибов А.Г.:** Спасибо большое за действительно интересный доклад. Скажите, вы выбирали эти сетки мутантов, там 150 или сколько, они выбирались рационально или у вас был комбинаторный или программой выбирали? Потому что у вас несколько параметров надо было оптимизировать, чтобы эти мутанты выбирать.

**Кост Л.А., соискатель:** Спасибо за вопрос. Уточню: мутанты - вы имеете в виду пермутированные варианты FusionRed?

**Габибов А.Г.:** Там таблица у вас была. Да, конечно.

**Кост Л.А., соискатель:** В данной таблице представлены только наиболее удачные варианты из всех разработанных. Здесь сочетались оба метода: мы делали пермутированные варианты на основе ранее полученных данных о кристаллической структуре пермутированных вариантов, в этом было, безусловно, рациональное звено. Но также в задаче создания пермутированных вариантов некоторый элемент перебора безусловно тоже есть.

**Габибов А.Г.:** Спасибо. А вот эти два кусочка бочки вы разделяли, я пропустил может быть, вы осуществляли этот дизайн на основе электростатических взаимодействий? Потому что фактически в природе такая модель есть, это SH-домены. Вот так они гуляют и знают, как связываться в какой-то момент. Здесь у вас по-другому было?

**Кост Л.А., соискатель:** В данном случае мы брали успешные варианты, которые демонстрировали яркие и быстро созревающие пермутированные варианты, и, исходя из них, пробовали создавать бимолекулярные варианты.

**Габибов А.Г.:** Это какие-то начальные этапы синтетической биологии. Спасибо большое.

**Дзантиев Б.Б.:** Любовь Александровна, спасибо, очень интересный доклад, элегантный подход. Когда говорим о мембранном потенциале - это уже какая-то физическая величина, поэтому вопрос, насколько этот ваш сенсор на основе этого белка воспроизводимо мерит потенциал? Если вы произведёте много измерений на протяжении одного дня, разных

дней - как в этом плане? Фактически, у вас же должен быть инструмент, а не просто результат для статьи.

**Кост Л.А., соискатель:** Спасибо за вопрос. Безусловно, мы считали положительным наличие сигнала только при его достоверном воспроизведении. Как в одной культуре в разное время, так и на нескольких культурах клеток.

**Дзантиев Б.Б.:** Результаты совпадали?

**Кост Л.А., соискатель:** Да, результаты коррелировали.

**Дзантиев Б.Б.:** Хорошо, спасибо.

**Долгих Д.А.:** Спасибо за очень интересный доклад. Видно, что объём работы очень большой. Всё это очень интересно. У меня два вопроса. Когда вы делали эти десятки мутантов, вы видели, что может быть примерно половина из них работает, половина не работает, не светится. Вы как-то пытались проанализировать, почему в этих случаях, какую-то систематику навести, чтобы двигаться дальше? Вторая часть этого вопроса: если двигаться дальше, вы сказали, что вы получили такой индикатор, который не уступает лучшим имеющимся. Насколько, если можно это определить, вам удалось подойти к созданию идеального индикатора? Вообще возможно ли это в принципе и видите ли вы какие-то дальнейшие пути движения в этом направлении? Спасибо.

**Кост Л.А., соискатель:** Спасибо за вопрос. На первую его часть: относительно наблюдений наших и выводов из того, что мы видели с пермутированными вариантами, могу сказать, что мы видели различные варианты при разработке на основе петельных вариантов и на основе вариантов с разрывом вблизи хромофора и делали из этого, соответственно, выводы. Также безусловно, если мы наблюдали некоторое снижение свойств для набора пермутантов, мы могли попробовать соседнюю точку и наблюдали улучшение или ухудшение, и соответственно с этим двигались дальше. При этом, безусловно, огромный вклад вносит предыдущее исследование на основе красных флуоресцентных белков, однако часто предыдущий опыт не репрезентативен на нашей белке. Относительно нашего индикатора конечного, его характеристики, с точки зрения кинетики, ставят его в один ряд с наиболее быстрыми индикаторами. Однако совокупность его характеристик пока недостаточна для того, чтобы утверждать, что нам удалось приблизиться к в целом идеальному индикатору. Но мы видим различные пути улучшения, которые надеемся осуществить, и я верю, что однажды будет создан такой инструмент.

**Долгих Д. А.:** Спасибо.

**Иванов В.Т., председатель:** Похоже, вопросы иссякли. Спасибо. Отдыхайте ненадолго. Мы должны, по-видимому, ознакомиться с отзывами. Я обязан дать слово научному руководителю, если он хочет охарактеризовать диссертанта.

**Богданов А.М., научный руководитель:** Уважаемые коллеги, постараюсь не очень долго. Любовь Александровна относится к выпускникам медико-биологического факультета РНИМУ имени Пирогова. Ребята, пришедшие к нам из этого места, здорово укрепили коллектив и в целом научную школу Лукьяновскую. Выпускники этого учебного заведения обладают своим специфическим набором качеств, очень ценных для учёного, как то: выраженная нацеленность на практический результат, смелость, дерзость. Любовь Александровна, также, как и лучшие из выпускников её alma mater характеризуется с этими качествами. Часть этих качеств поспособствовала тому, что она вообще в принципе влезла в этот непростой проект. Начиналось всё в своё время, когда в Институте высшей нервной деятельности был семинар такого классика флуоресцентной нейровизуализации Лоуренса Коэна. Он тогда сказал, что если вы сделаете красные генетически кодируемые индикаторы, вы будете просто герои. Думаю, Любовь Александровна восприняла это, как вызов. Другие качества, такие как упорство, оптимизм, позволили продираться через эту чащу. Это было непросто, не быстро, не все пройдены кочки. Но тем не менее, поскольку речь в этом зале о высокой квалификации диссертанта, у меня сомнений нет, что качества, которые из alma mater достались Любви Александровне, они были закреплены в процессе выполнения диссертационной работы и сформировали её, как зрелого исследователя. Более того, надо сказать, что за годы реализации проекта Любовь Александровна успела самореализоваться и в других сферах жизни замечательно совершенно, и мне кажется, это тоже всегда стоит поддерживать. Мои личные впечатления от взаимодействия и сотрудничества с Любовью Александровной сугубо положительные, я надеюсь на продолжение наших совместных работ, ну и, безусловно, хочу поддержать диссертацию. Спасибо.

**Иванов В.Т., председатель:** Теперь можно заслушать заключение ИБХ, где выполнялась работа и отзыв ведущей организации.

**Олейников В.А., учёный секретарь:** *(Зачитывает заключение организации, где выполнялась диссертация).* Во-первых, заключение организации, где выполнялась работа: это наш институт, Институт биоорганической химии. Биографические данные уже были оглашены из личного дела, уже прозвучало, что она – выпускница Медицинского университета. Научный руководитель только что выступал, Алексей Михайлович Богданов – это тоже наш институт. Вообще говоря, всё это рассматривалось на

соответствующем заседании семинара и дано заключение. По итогам обсуждения данной работы принято следующее заключение: работа посвящена актуальной проблеме нейробиологии – созданию индикаторов мембранного потенциала, который может применяться для регистрации событий в режиме реального времени. Достоверность результатов работы сомнений не вызывает. Диссертационная работа выполнена на высоком теоретическом и практическом уровнях. Основные результаты работы получены лично автором, автор лично представляла результаты работы на международных конференциях. Опубликовано 4 серьезных работы в хороших журналах. При написании диссертации соблюдены все требования и положения. Сама диссертация соответствует требованиям и положениям о присуждении учёных степеней. На основании вышеизложенного, диссертация рекомендуется к защите на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3. Молекулярная биология». Заключение принято на открытом заседании отдела биофотоники нашего института. Единогласное голосование «за», подписано завотделом биофотоники, членом-корреспондентом РАН Константином Анатольевичем Лукьяновым, утверждено директором нашего института, академиком Александром Габибовичем Габибовым.

*(Зачитывает отзыв ведущей организации. Отзыв положительный).* Теперь отзыв ведущей организации. Тоже отзыв положительный. Ведущая организация – Федеральный исследовательский центр фундаментальной основы биотехнологии РАН. Пишется, что разработка оптогенетических инструментов для визуализации электрической активности клеток и тканей живого интактного организма представляет собой важную методологическую задачу, решение которой необходимо для развития современной нейробиологии. О самой диссертации: введение, обзор литературы, указанные некие количественные параметры, дальше важно, что литературный обзор написан понятным языком и хорошо подготавливает читателя к восприятию следующих разделов. Материалы и методы содержат достаточно подробное и ёмкое описание методической базы, на которую опирается работа, помимо стандартных методов использованы подходы модульного клонирования на основе технологии Golden gate, метод локальной фиксации потенциала. Далее, содержание представлено в разделе результаты и обсуждения. Несколько этапов: во-первых, описывает процесс модификации флуоресцентного белка FusionRed, второй этап – это разработка ГКИМП (генетически кодируемый индикатор мембранного потенциала), третий этап – всесторонняя оптимизация молекулы ГКИМП. Выводы работы логично следуют из поставленной цели и задач. Содержание автореферата соответствует положению. Недостатки: несмотря на общую высокую оценку, есть некие замечания и вопросы к диссертационной работе.

1. Рекомендуется произвести измерения квантовых выходов флуоресценции вариантов индикатора (указаны варианты) и попытаться построить модель, связанную с цис-транс-изомеризацией хромофора при изменении длины междоменного линкера.

2. Требуется комментарий к вопросу о возможности возникновения нежелательных перекрёстных взаимодействий при использовании индикаторов на основе белка престина в клетках млекопитающих. Насколько престин генетически далёк 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.

Указанные замечания не носят принципиального характера. Далее о публикациях, где была опубликована работа. Диссертационная работа была заслушана на межлабораторном семинаре института биохимии имени Баха. Подписано заключение руководителем группы молекулярного моделирования, доктором физ-мат наук Хреновой Марией Григорьевной. Ну и соответственно, этот отзыв утверждён директором Федерального исследовательского центра фундаментальной основы биотехнологии РАН, доктор биологических наук Фёдоров Алексей Николаевич.

**Иванов В.Т., председатель:** Любовь Александровна, там были некие пожелания и замечания. Будем отвечать, правильно?

**Кост Л.А., соискатель:** Хочу выразить благодарность ведущей организации за внимание к моей работе и дельные замечания. По поводу предложенной проверки квантового выхода вариантов индикаторов, хочу сказать, что действительно было бы очень интересно проследить зависимость и построить некую физико-химическую модель, объясняющую данный феномен, однако с точки зрения методологии нашего исследования это потребовало бы выделения белков для каждого из промежуточных вариантов, которые мы экспрессировали исключительно в эукариотических клеточных линиях, то есть переход на прокариотические клеточные линии, выделение белков *in vitro* и регистрация характеристик, что является просто довольно большим по объёму заданием. По второму вопросу относительно престина, безусловно при разработке индикаторов на основе белков эукариот такая опасность, как крос-специфичные взаимодействия существует. Мы учитывали этот момент. Однако, мы считаем, что в случае использования белка престина, риски минимальные, поскольку престин является белком высокоспециализированных нейрональных клеток слухового анализатора и также для него неизвестны потенциальные партнеры для взаимодействий. Спасибо за вопросы.

**Иванов В.Т., председатель:** Мы можем двигаться дальше и перейти к заслушиванию официальных оппонентов. Александр Михайлович Сурин, который представляет два института – центр здоровья детей и институт общей патологии и патофизиологии – оба учреждения Минздрава.

**Сурин А.М., оппонент:** *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).* Уважаемый президиум, уважаемые члены аттестационного совета, коллеги. Мне, во-первых, конечно, тоже очень приятно здесь выступать, это становится для меня приятной традицией. Я каждый раз вспоминаю, что первая защита в этом здании кандидатских диссертаций была второй моей защитой. Было это, правда, 30 лет тому назад. В этот промежуток времени между тем периодом и сегодняшним днём в научно-популярных фильмах, посвящённых тому, как работает мозг, можно было увидеть замечательную анимацию: нейрончики соединены между собой, и сигнал бежит по дендритам или аксону, яркой такой искоркой. Тогда это был поэтический образ, художественное видение, никому и в голову не приходило в тот момент, что учёные достигнут через несколько десятков лет именно этой ситуации. Сегодняшний доклад – это такое чудесная и в тоже время сугубо научная, оцифрованная реализация такой поэтической мечты. Иногда поэты бывают гораздо прозорливее даже самых смелых учёных. Любовь Александровна свой литературный обзор начала цитированием статьи Хочкина и Хаксли 195 года. Сейчас 70 лет с выхода этой статьи. Мы видим, что метод не устарел, не ушёл в архивы, а всё больше и больше развивается. В своём докладе соискатель диссертации показал как раз начало этих исследований, именно с электрофизиологии, условный нейрон, условный шприц и так далее, и закончила тем, чему посвящена её диссертация. Мне показалось, там на правом краю этого слайда не хватало ещё одного – о том, как выглядит мозг, если в его геном, нейронов прежде всего, внедрить ген флуоресцентного индикатора и, если бы в этой защите был такой слайд, я надеюсь, что в следующих защитах такие картинки обязательно появятся, потому что это поражает красотой о том, как за эти самые миллисекунды, за которые боролась Любовь Александровна эти 6 лет, по поверхности клетки бежит изображение. Активность мозга мы видим в цветах. То, как работает, теперь реально мозг. Конечно, пока на уровне экспериментальных животных, точнее мышек. Но принципы устройства очень близки и можно представить себе, что происходит и у нас, у людей. Потому что истинная направленность этой работы – это, конечно, интерес к людям, теоретический, что происходит в мышке, или в культуре клеток, полученных из мышки, или даже ещё более простой вариант, который был здесь убедительно продемонстрирован – это клетки раковые, бессмертные, НЕК-293 или РС-12. Но всё это необходимые этапы, единые. И в этом отношении работа Любви Александровны и подобные работы



абсолютно необходимы, несмотря на то, что уже около сотни подобных индикаторов перепробованы. У них, к сожалению, у всех одно не очень приятное свойство, а именно – относительные изменения сигнала (даже, если сам сигнал хороший, квантовый выход, приближающийся к 0,5 – это шикарная интенсивность флуоресценции), но относительные изменения очень маленькие. И, наверное, должен наступить какой-то критический набор информации о том, как же качественно преодолеть этот барьер, этой единицы процентов или доли процентов. Несколько процентов – с одной стороны это вроде много при современных камерах и чрезвычайно стабильных источниках возбуждения, сигнал шума может быть маленький. Но всё-таки этому некий есть предел и тогда мы делим эти единицы процентов на сто милливольт в знаменателе, получается какая-то не очень оптимистичная величина. Но другого выхода, кроме как размышлять, придумывать, моделировать то, что было продемонстрировано в данной работе, к сожалению, видимо пока нет. Может быть, должен наступить какой-то критический уровень, когда будут придуманы принципиально новые подходы. Я мог бы фантазировать на эту тему, но лучше это в кулуарах, поскольку время всё-таки у всех дорогое. Структура традиционной повестки таких выступлений, структура диссертации. Естественно, она традиционная, содержит приличное количество страниц, 33 рисунка, 122 ссылки – всё, как требуется для работ, которые имеют относительно небольшую историю, если начинать считать от флуоресцентных белков вообще, то 30 лет, а если от сенсоров, то, конечно, на десятилетия меньше. Обзор литературы вполне адекватен, хорошо иллюстрирован и даёт довольно чёткое представление о том, что делается в этой области не только для профессионалов, но и для людей, которые относятся к этому по касательной – я считаю себя таким, который является скорее потребителем, чем экспертом в этой области. И мой следующий коллега, который будет выступать вторым оппонентом, он, насколько я знаю, как раз специалист в области молекулярной генетики и создания таких конструкторов. Я думаю, он пояснит эту сторону гораздо более детально. Здесь я только что хочу сказать, что прооппонирав примерно два десятка диссертаций, я заметил такую удивительную вещь: из этих двух десятков только в двух диссертациях подзащитный упоминал в списке литературы своих оппонентов. Вообще по идее, оппонент – это тот человек, который специалист именно в твоей области. И как-то странно, когда в списке литературы работы оппонента не упоминаются. Любовь Александровна – третье исключение в моей карьере оппонента. Она своего оппонента упомянула. С моей точки зрения это очень приятно и похвально. Материалы и методы – здесь что можно сказать? Каждый, кто работает в институте биоорганической химии уже не может отойти от канонов института биоорганической химии, созданных Шемякиным, Юрием Анатольевичем Овчинниковым.

Это в базе всего, конечно. Химическое, чёткое отношение к структуре и максимально полное использование методов от тех, которые являются доминирующими (как методы генетики, молекулярной биологии в работе Любовь Александровны), так и те, которые идут необходимыми шагами далее. Это, скажем, экспрессия белка, выделение, очистка, характеристика структуры вплоть до рентгеновской, характеристика спектральных свойств, на этом основании – отсеивание неудачных вариантов и выбор оптимальных. Далее, это трансфекция клеток и далее по восходящей от легко трансфецируемых раковых линий (я уже упомянул НЕК-293 или РС-12) к гораздо более трудной ситуации, к нейронам. Здесь, насколько я понял, Любовь Александровне удалось применить метод электропорации, который повысил эффективность трансфекции до двузначных чисел, аж до 20%, что для меня, как для человека, который занимается именно этой областью, очень хорошо, это близко к рекордным значениям. Я думаю, наша лаборатория, в этом смысле у вас получится. И ещё, когда говорят, обычно есть графа «Практическая значимость», вот одну практическую значимость я уже упомянул, а именно то, что продемонстрирована эффективность такого метода, такого подхода, который позволяет провести хороший высокий процент экспрессии в терминально дифференцированных клетках. Нейроны – терминально дифференцированные клетки, и по этой причине внедрить в них что-нибудь чужеродное – чрезвычайно трудно. И поэтому опыт в этом направлении очень важен, особенно, если это прямо здесь, рядышком, в дружественной лаборатории. Основные результаты – я не буду касаться того, насколько интересны и важны, насколько оригинальны выполнены все те процедуры, которые были здесь продемонстрированы, в этом прекрасном докладе, очень хорошо иллюстрированном. Я прочитал несколько раз автореферат и диссертацию, но всё равно почерпнул для себя что-то новое из того, насколько это было удачно иллюстрировано. Были получены самые разные комбинации, выбраны оптимальные из сенсоров, где в качестве сенсорного домена был использован четырёх спиральный фрагмент или сенсорная часть фосфатазы. Это традиционный, надёжный сенсорный домен. Но на этом не остановились, убедившись, что революционного результата он не даёт. Авторы пошли дальше. К сожалению, я не нашёл объяснений, почему был выбран именно Престин, да ещё и из какой-то монгольской песчанки. Было бы интересно, как авторы логически дошли именно до такого выбора Престина. Я немножко сам занимался волосковыми клетками внутреннего уха тоже грызунов. В то время, это было примерно 25 лет назад, никто не знал, о существовании Престина. Мы думали, что изменение длины волосковой клетки и, соответственно, передача сигнала с неё на следующий нейрон осуществляется исключительно за счёт изменения астматического давления, когда сдвиг волосков на одном конце этих клеток

приводит к открыванию мощных ионных каналов, прежде всего кальциевых и натриевых, и это вызывает резкое изменение осмотического давления, клетка начинает удлиняться, поскольку раздуванию препятствует цито-скелет. И этого, казалось, было достаточно. Но, оказывается, природа ещё хитрее и помимо этого механизма, потому что мы же его не можем закрыть, он работает, а оказывается работают ещё и дополнительные структуры, которые по-видимому обеспечивают скорость передачи сигнала от апикального конца волосковой клетки, которая имеет размер по клеточным масштабам очень большой, 100 микрон, на другую. И выбор преслина в этом случае мне кажется очень удачным, очень оригинальным, насколько я понял вы были первыми, кто это придумал уж по крайней мере для этих целей. Завершая хвалебную часть, я хочу отметить, повторить то, что сказала сама Любовь Александровна, а именно, что такой подход превращения механических перемещений сенсорной части в оптические сигналы репортерной части, он абсолютно универсальный. В нашей лаборатории мы применили этот вариант для определения внутриклеточного АТФ. АТФ-фаза, которая служит линкером между зелёными и красными белками, как раз и осуществляет это самое большое механическое перемещение, сближает зелёный с красным белком. Усиливается перенос энергии и идёт детекция. То, что было продемонстрировано в работе Любови Александровны – это, по-видимому, ещё один интересный вариант того, как можно было бы использовать этот природный феномен. Для того, чтобы было ясно, что я сам это читал, пересказываю свои собственные мысли, я перейду к вопросам и замечаниям. Поскольку, к счастью идеалов в природе не существует, можно придумать и вопросы тоже. Вопросы такие: во введении написано, я цитирую: «Разумно предположить, что яркий индикатор, сигнал которого регистрируется в одном спектральном канале, является наиболее предпочтительным решением для большинства экспериментальных задач». Я позволил себе не согласиться, хотя Любовь Александровна в своём докладе уже эту тему упомянула. С моей точки зрения, всё-таки рациометрический, а не интенсификационный вариант лучше, потому что он позволяет избежать такие артефакты, как выход из фокуса, что чрезвычайно важно, например, когда вы перейдёте к животным. Животные дышат, у них сердцебиение, сигнал всё время модулируется естественными процессами, которые имеются в живом организме. Поэтому рациометрический подход в этом отношении незаменим, а вы-то стремитесь именно к этому. А препятствие главное, которое вы совершенно справедливо упомянули, именно стоимость такого эксперимента, стоимость оборудования, конечно. Но она тонет на фоне тех усилий, которые вы приложите для того, чтобы избавиться от артефактов, используя одноволновую. Вы, потратившись больше на прибор, здорово сэкономите на интерпретации и на повторных экспериментах. Дальше, второй вопрос. В

главе «Материалы и методы» было бы ещё более полезно для тех, кто использует транзиторную трансфекцию, если бы автор указала, какие концентрации плазмиды использованы, какова была длительность инкубации клеток с плазмидами и особенно с клетками мозга мыши, поскольку, как я уже упомянул трансфекция терминально-дифференцированных клеток очень трудна и поэтому такие детали, как сколько времени, какой возраст культуры – они очень критичны. Третий вопрос: на рисунке 11 показано изображение культуры клеток НЕК293, в тексте указываются данные РС-12. Четвертый вопрос, он чисто формальный. В экспериментальной работе, которая не является математическим исследованием, писать дифференциалы – не очень хорошо. Нужно не дифференциалы, а дельты указывать, потому что мы имеем дело не с бесконечно малыми превращениями функций в ответ на бесконечно малые превращения аргумента. Пятый вопрос: на странице 26 сказано «эквивалентный сайт окружён положительно заряженными остатками, так называемыми координирующими остатками. Из этих положительно заряженных остатков, положительными являются только Arg399, а все остальные – не заряженные и, более того, два остатка вообще гидрофобные. Рисунок 27 - из контекста понятно, что изображение клеток культуры имеют иллюстративный характер. Это показывает возможность экспрессии конструкции. Всё же необходимо было указать, из какой же части мозга были получены клетки: из коры, гипокампа, мозжечка. И каким образом, на какое количество клеток и посадок культуры подсчитывали эффективность трансфекции. Но это вопрос для тех, кто пытается работать *in vitro* и переносит эти данные на неё. В заключении хочу подчеркнуть, что упомянутые замечания носят чисто технический характер и являются скорее советами по улучшению, чем констатацией серьезных ошибок. В целом диссертационная работа Кост Любови Александровны представляет собой полноценное, грамотно спланированное и проведённое научное исследование на актуальную тему, имеющее как практическое, так и фундаментальное значение. В заключении актуальность и новизна полученных результатов, высокий методологический уровень работы, теоретическая значимость позволяют сделать заключение о том, что диссертационная работа представляет собой законченную научно-квалификационную работу, которая полностью соответствует критериям, установленным в положении о присуждении учёных степеней. И диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3. Молекулярная биология».

**Иванов В.Т., председатель:** Вывод понятен, тем не менее диссертант, наверное, хочет поспорить с вами или согласиться.

**Кост Л.А., соискатель:** Хочу выразить огромную благодарность Александру Михайловичу за неподдельный интерес к моей работе, интересные вопросы, видение как общей идеальной картины светящегося мозга, так и конкретных экспериментальных проблем, и сложностей. Относительно замечаний. Готова ответить. По поводу наших предпочтений к интенсификационным индикаторам, по сравнению с ратиометрическими, безусловно, как у одного, так и у другого метода есть свои важные плюсы и минусы. Возможности, которые предоставляет ратиометрическое измерение – оно, неоспоримо, очень удобно для некоторых аспектов. Однако в случае использования индикатора именно мембранного потенциала важным аспектом является скорость регистрации сигнала. Дело в том, что при использовании ратиометрического измерения происходит считывание сигнала в двух спектральных каналах и имеет место задержка при переключении между одним и вторым каналом, что вносит свой вклад в результирующую скорость измерения. В случае измерения кинетики ответа электровозбудимых клеток это оказывает серьёзное влияние. Помимо этого, аргументом в пользу интенсификационных индикаторов является пример использования на практике индикаторов кальциевых, кальциевые индикаторы также используются для измерения потенциала, как косвенный признак и популярность кальциевых сенсоров на основе одного флуоресцентного белка, как существует в семействе GCaMP – она гораздо выше, чем для надёжных хороших аналогов на основе двух белков. Помимо стоимости этих измерений, важной характеристикой является как наличие этого специализированного оборудования в широком кругу лабораторий, так и наличие специалистов, которые умеют этим оборудованием пользоваться. Безусловно, это можно перевести в формат стоимости, однако, на мой взгляд не совсем. По поводу замечаний дальнейших. Благодарю за замечания относительно содержания главы «Материалы и методы», согласна полностью, что гораздо подробнее следовало описать некоторые методологические моменты, могу прокомментировать, что с точки зрения трансфекции линий НЕК293 были использованы липофильные трансфекционные агенты, инкубация проводилась по протоколу производителя в течение 24-48 часов после трансфекции. Для клеток РС-12 и нейронов производилась электропорация. Этот метод является с одной стороны более эффективным с точки зрения доставки плазмиды внутрь целевой культуры, однако обладает очень серьёзным уровнем гибели клеток в процессе процедуры. И для них более длительная инкубация применяется, от 2 суток в случае РС-12 и 11-14 суток в случае нейронов. Следующий вопрос по поводу использования клеток феохромоцитомы РС-12: в работе не представлены изображения. Действительно, было бы хорошо, если бы они там были. Однако, здесь существует методологическая сложность ввиду того, что после трансфекции данные клетки высаживаются на покровное стекло,

которое для тестирования методом patch clamp переносится на электрофизиологическую установку и регистрация сигнала сквозь чашку и покровное стекло довольно затруднительна. Помимо этого интересно было бы получить фотографии клеток PC-12, которые способны дифференцироваться по нейрональному пути и образовывать нейроноподобные отростки. Мы же передавали данные клетки сразу же к нашим коллегам в Институт высшей нервной деятельности, поскольку, когда данные клетки уже из суспензионной культуры становятся прикреплёнными и отращивают отростки, их перемещение крайне нежелательно и может отразиться на жизнеспособности клеток. Таким образом, мы просто физически не имели возможности получить данное изображение, поскольку в момент, когда клетки выглядели репрезентативно, их уже изучали наши коллеги из Института высшей нервной деятельности. Благодарю за замечание по поводу дифференциалов или дельта. Совершенно согласна, что нужно быть осторожнее при использовании данных терминов. Однако существует некоторая двойственность в литературе, которая вызвала и у нас некоторые затруднения с тем, какой вариант правильнее использовать. Про положительно заряженные и координирующие остатки – да, произошло некоторое смешение терминов. Действительно координирующие остатки характеризуются различными, там есть и электронейтральные и отрицательно заряженные, в нашем случае это некоторое упущение – приводить это в таком виде. По поводу экспрессии в нейрональной культуре, также согласна полностью, что нужно было немножко подробнее описать процедуру. Использовались кортикальные нейроны эмбрионов мыши, которые безусловно являются высокоспециализированными дифференцированными клетками, однако это эмбриональная культура, которая способна к некоторой доле восприятия чужеродных плазмид и экспрессии. Надеюсь, я ответила на все вопросы. Спасибо ещё раз за детальный интерес к моей работе.

**Иванов В.Т., председатель:** Речь шла об ответах на вопросы первого оппонента. У нас есть ещё второй оппонент. Это у нас Субач Виктор Васильевич, который не смог присутствовать по уважительным причинам на защите, но он дал свой отзыв.

**Олейников В.А., ученый секретарь:** *(Зачитывает отзыв официального оппонента. Отзыв положительный).* У меня в руках отзыв второго официального оппонента. Отзыв полностью положительный. Поскольку прозвучало уже очень много и первый оппонент очень подробно всё рассказывал, поэтому я выдержки, основные положения этого отзыва зачитаю. Относительно актуальности, новизны, пишется, что визуализация активности нейронов согласно изменениям мембранного потенциала даёт возможность изучения работы мозга и открывает возможность для изучения онкологии, процессов старения и так

далее. Далее, посвящена разработке и характеристике генетически кодируемых индикаторов. И дальше целая серия фраз, которая начинается со слова «впервые»: впервые были разработаны индикаторы мембранного потенциала, впервые автор обнаружил альтернативный способ изменения полярности индикатора, автор впервые обнаружил, что нарушение циклизации трипептида и хромофора не препятствует его дальнейшим превращениям ну и так далее. Подчёркивается новизна и актуальность работы. Далее о структуре, количестве страниц, количество ссылок, в введении обоснована актуальность темы, вводится в саму проблему. Обзор литературы написан ясным, хорошим, научным языком. Широко охватывает материал, даёт полное представление о проблемах и задачах в данной области исследований. Материалы и методы достаточно подробно описаны. Результаты – 6 частей, в очень подробном изложении мы сегодня это слышали от ведущей организации и от Александра Михайловича Сурина. И наконец, последний этап, пишется, что на основе красного флуоресцентного белка FusionRed и электроподвижного белка из млекопитающих престин, разработаны различные топологические варианты индикаторов мембранного потенциала, охарактеризовала их свойства. Хорошо опубликована работа, автореферат соответствует содержанию диссертации. По поводу недостатков: отмечу, что в диссертации присутствуют опечатки и орфографические ошибки, которые не относятся к научной сути работы. А по работе замечания во введении, страница 4 – неясно, что имелось в виду под «высоким пространственным разрешением» - возможно высокая яркость или локализация на мембране? Второе: «Материалы и методы», страница 37 – не описано, чем элюировали белок после связывания с носителем. Третье: «Результаты обсуждения», страница 45. Упоминается вариант сrF-аббревиатура, 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. Ну и наконец, в заключении пишется, что диссертация полностью соответствует положениям ВАК, а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3. Официальный оппонент, кандидат химических наук, старший сотрудник лаборатории нейронаук Курчатовского комплекса нано-биоинформационных и когнитивных наук и природоподобных технологий федерального государственного бюджетного учреждения национально исследовательский центр Курчатовский институт Субач Фёдор Васильевич.

**Иванов В.Т., председатель:** Любовь Александровна, просьба ответить на замечания.

**Кост Л.А., соискатель:** Также хочу поблагодарить моего оппонента за детальное изучение моей работы и важные замечания. По поводу первого замечания, действительно возможно не очень корректно мы сформулировали мысль. Под высоким пространственным разрешением имелось в виду способность метода, описанного нами, по сравнению с микроэлектродными техниками или вариантами использования синтетических потенциал-чувствительных красителей, возможность визуализации субклеточных структур, таких, как аксоны, дендриты, сома и в целом отдельно выбранных популяций клеток, что недоступно для других методов. Второй вопрос, согласна полностью, что следовало подробнее описать процесс выделения белков, я не упомянула, что элюция проводилась имидазолом в повышающей концентрации от 10 до 100 мМ. И последний вопрос, относительно случайного ПЦР-мутагенеза, также признаю, что можно было описать подробнее эту процедуру, для выбранных лучших вариантов индикаторов проводился один раунд случайного ПЦР-мутагенеза, в результате которого был отобран вариант 76-73, содержащий замену R126I. И далее везде в работе использовался данный вариант.

**Иванов В.Т., председатель:** Мы приближаемся к завершающим этапам нашего обсуждения. Но тем не менее, у нас осталась ещё общая дискуссия в повестке протокола. Кто хотел бы участие принять? Добавить аргументов «за», «против»? Голосование. Что-то я не вижу ни оппонентов, ни поддерживающих.

**Олейников В.А., учёный секретарь:** Если можно, два слова скажу. На мой взгляд очень хорошая, интересная работа. Возник некий спор: радиометрия или не радиометрия. Но я думаю, что и в том, и в другом случае, конечно это очень эффективно. Вообще измерения мембранного потенциала – это очень важно, очень актуальная задача. Оптические методы характеризуются всегда тем, что мы работаем с живым объектом, который даёт информацию о функциях того объекта, который мы смотрим в том состоянии, в котором он находится в живом организме. В данной ситуации я считаю, что очень хорошая работа, интересная, перспективная. Изложено очень хорошо, понятно. Впечатления замечательные. Я призываю всех голосовать «за» присуждение степени.

**Иванов В.Т., председатель:** Мы вас услышали. Кто-нибудь ещё хотел бы добавить аргументов? Похоже, на этом мы завершаем нашу общую дискуссию. Я даю слово диссертанту для заключительного слова. Прошу.

**Кост Л.А., соискатель:** Я хочу поблагодарить моих научных руководителей и весь коллектив моей лаборатории. Я в данной лаборатории более 10 лет. Для меня это действительно очень большой кусок моей жизни. Также хочу поблагодарить мою семью,



которая очень меня поддерживала на всех стадиях работы и написания данной диссертации. Отдельно хочу поблагодарить моего мужа, который меня очень поддерживал и поддерживает. И моих родителей, которые помогают сейчас и сидят с моими детьми. Спасибо нашим коллабораторам. Без вас эта работа была бы невозможна. Мы бы не смогли за такой срок освоить электрофизиологические методы. И надеюсь, что продолжение этой работы будет таким же интересным, как и вся прошедшая работа. Спасибо большое.

**Иванов В.Т., председатель:** Спасибо. После этого мне остаётся одно: объявить перерыв на голосование. И я думаю, что подсчёт не будет долгим. У меня такое впечатление, предчувствие. Обычно перед тем, как голосовать, мы проверяем, есть ли какие-то замечания по поводу проектов заключения по двум диссертациям. И если есть, мы принимаем решение, что эти замечания будут учтены в конкретной работе авторов с авторами замечания. Есть такие сейчас соображения по поводу проекта заключения? Мы готовы к голосованию по поводу проекта заключения, я так понимаю. Объявляю перерыв. Голосуем.

*(Проходит тайное голосование).*

**Иванов В.Т., председатель:** Слушаем итоги голосования.

**Олейников В.А., учёный секретарь:** Счётная комиссия закончила свою работу. Кост Любовь Александровна. Роздано бюллетеней - 25. Оказалось в урне - 25, «за» - 25, «против» и недействительных нет.

**Иванов В.Т., председатель:** Очень опасные результаты. Если хоть одна ошибка, должны быть возражающие. Есть ли возражающие? Не вижу. Значит мы утверждаем итоги голосования. Давайте поздравим с прекрасной защитой и последний вопрос: есть ли возражения против утверждения заключения по поводу защиты? *(Заключение совета принято единогласно)*. Принимаем заключение. И спасибо за участие в работе в нашем заседании. До встречи.

Заместитель председателя  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Ефремов Роман Гербертович

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников Владимир Александрович