



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

№	
На №	от

УТВЕРЖДАЮ

Директор
Федерального
исследовательского центра
«Фундаментальные основы
биотехнологии»
Российской академии наук
доктор биологических наук
Федоров Алексей Николаевич
«15» февраля 2022 г.



ОТЗЫВ

Ведущей организации на диссертационную работу Л.А. Кост «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

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. С начала разработки таких молекулярных инструментов, пришедших на смену классическим электрофизиологическим методикам, прошло более 20 лет. Однако создание генетически кодируемых индикаторов с оптимальным набором характеристик продолжается, чему и посвящена данная диссертационная работа.

Диссертация Кост Л.А. построена в соответствии с общепринятыми принципами. Она состоит из введения, обзора литературы, цели и задач, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка литературы.

В обзоре литературы автор описывает существующие подходы, применяемые для регистрации потенциала мембраны живых клеток, историю вопроса, а также плюсы и минусы каждого метода. Освещены известные варианты дизайна и принципы работы генетически кодируемых индикаторов мембранного потенциала (ГКИМП), а также сформулированы главные характеристики ГКИМП, составляющие портрет идеального индикатора. Отдельное внимание уделено рассмотрению репертуара потенциал-чувствительных доменов (ПЧД), применявшихся для разработки ГКИМП, а также описаны свойства белка престина, потенциального кандидата на роль такого домена. В целом, литературный обзор написан понятным языком и хорошо подготавливает читателя к восприятию следующих разделов.

Раздел «Материалы и методы» содержит достаточно подробное и ёмкое описание методической базы, на которую опирается работа. Помимо стандартных методов молекулярной и клеточной биологии, также описаны использованные подходы модульного клонирования на основе технологии Golden Gate и метод локальной фиксации потенциала.

Содержательная часть работы представлена в разделе «Результаты и обсуждение». Автор представила работу в виде трех последовательных этапов. Первый этап описывает процесс модификации флуоресцентного белка FusionRed, создание на его основе пермутированных и бимолекулярных вариантов для использования их в роли репортерного домена индикатора мембранного потенциала.

На втором этапе проводилась разработка ГКИМП на основе данного ФБ и классического потенциал-чувствительного домена (из потенциал-чувствительной фосфатазы асцидии *Ciona intestinalis*) в новой, ранее не применявшейся в разработке ГКИМП топологической комбинации этих белковых мотивов. Тестирование полученной химерной молекулы в эукариотических клетках НЕК293Т показало, что данная топологическая комбинация применима для создания ГКИМП.

Третий этап заключался во всесторонней оптимизации молекулы ГКИМП. Так, путем модификации длины и состава междоменного полипептидного линкера удалось создать варианты индикатора с субмиллисекундной кинетикой флуоресцентного ответа. А также был обнаружен феномен смены полярности флуоресцентного ответа индикатора. При укорочении полипептидного линкера наблюдалась инверсия сигнала: варианты с “длинным” (17-25 аминокислотных остатков) линкером в ответ на деполяризацию затухали, в то время как для вариантов с “коротким” (2-5 аминокислотных остатков) линкером регистрировалось разгорание флуоресцентного сигнала. Наблюдаемый результат возможно использовать для разработки широкого круга вариантов химерных молекул на основе флуоресцентных белков, но также он представляет интерес с точки зрения фундаментальных основ данного феномена.

Помимо этого, в работе Кост Л.А. описано создание индикатора мембранного потенциала на основе белка престина. Данный белок играет ключевую роль в процессе трансдукции сигнала в слуховом анализаторе млекопитающих, в основе его функционирования лежит явление электроподвижности. Стоит отметить ограниченность репертуара существующих потенциал-чувствительных доменов, на основе которых разрабатываются ГКИМП. Успешное применение престина обогащает репертуар ПЧД, что является серьезным вкладом в развитие области и демонстрирует научно-практическую значимость полученных результатов.

Выводы диссертационной работы логично следуют из поставленных цели и задач исследования. Содержание автореферата соответствует основным положениям диссертации.

Несмотря на общую высокую оценку, есть некоторые замечания и вопросы к диссертационной работе:

1. Рекомендуется 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 к вопросу о возможности возникновения нежелательных перекрестных взаимодействий при использовании индикаторов на основе белка претина в клетках млекопитающих. Насколько претин 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?

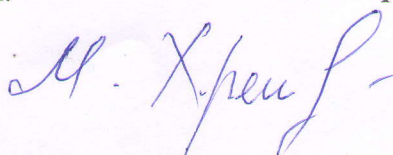
Указанные замечания не носят принципиального характера, не влияют на выводы и не снижают высокой научной ценности диссертационной работы. Представленные в работе результаты достоверны, сделанные выводы обоснованы и подтверждены экспериментальными данными.

Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых журналах и представлены в материалах конференций. Работа представляет собой законченное научное исследование и соответствует требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям "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.

Диссертационная работа была заслушана на межлабораторном семинаре Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук (Протокол № 1 от 1 февраля 2022 г.).

Руководитель группы молекулярного моделирования, д.ф.-м.н.

Хренова Мария Григорьевна



Институт биохимии им. А.Н. Баха
ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН
г. Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2.
119071 Российская Федерация
Тел: +7 (495) 954-52-83
E-mail: mkhrenova@lcc.chem.msu.ru