

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу **Барыкиной Натальи Викторовны** «Разработка новых генетически кодируемых флуоресцентных кальциевых индикаторов для визуализации нейронов», представленную на соискание учёной степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Изучение активности мозга на уровне популяций нейронов и отдельных клеток является актуальной задачей, на решение которой направлены усилия нейробиологии, молекулярной биологии и биоорганической химии. При генерации потенциала действия, то есть непосредственно во время активности нейронов, происходит изменение концентрации ионов кальция в цитоплазме нейронов. В связи с этим широкое распространение получило использование кальциевых индикаторов для мониторинга ионов кальция в живых клетках. Среди кальциевых индикаторов особо стоит выделить генетически кодируемые кальциевые индикаторы, которые являются химерными белками, состоящими из флуоресцентного домена и кальций-связывающего домена. Преимуществами генетически кодируемых индикаторов является возможность их экспрессии под тканеспецифичными промоторами, в частности в мозге животных, а также в определенных компартментах клетки, таких как эндоплазматический ретикулум и митохондрии. Генетически кодируемые кальциевые индикаторы позволяют наблюдать за активностью популяций нейронов в мозге животных в течение нескольких месяцев, возвращаясь к ним по мере необходимости, и одновременно изучать зависимость паттернов активности нейронов от поведения животного в норме и патологии. Подобные эксперименты также необходимы для изучения формирования памяти и процессов обучения.

Несмотря на все вышеперечисленные достоинства, разработанные к настоящему времени кальциевые индикаторы имеют ряд недостатков. Так, в последнее время все больше данных накапливается относительно влияния кальциевых индикаторов на нейрональную активность за счет связывания кальмодулина, входящего в их состав, с белками-партнерами внутри нейрона. Изучение активности нейронов в живом мозге требует создания новых более ярких вариантов генетически кодируемых меток. В этой связи бесспорно актуальна тема диссертационной работы Натальи Викторовны Барыкиной, посвященной созданию новых генетически кодируемых индикаторов для мониторинга изменения концентрации ионов кальция в нейронах. Автором предложены два новых подхода для создания генетически кодируемых кальциевых индикаторов.

Диссертационная работа Н.В. Барыкиной построена по традиционному плану и состоит из следующих разделов: введение, обзор литературы, материалы и методы,

результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Работа изложена на 177 страницах печатного текста и включает 77 рисунков и 8 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 205 ссылок, включая оригинальные статьи, обзоры литературы и современные работы 2018 года.

В разделе «Введение» обоснованы актуальность и выбор темы исследования, сформулирована цель и задачи работы, отражены теоретическая и практическая значимость работы и ее новизна. Обозначена важность флуоресцентных кальциевых индикаторов для изучения процессов, происходящих в мозге животных.

В обзоре литературы описано большинство разработанных на настоящий момент генетически кодируемых кальциевых индикаторов, их преимущества и недостатки, рассматривается роль ионов кальция в нейроне и пути попадания ионов кальция в цитоплазму и компартменты нейрона. Также описаны ключевые характеристики кальциевых индикаторов и задачи, которые удалось решить с помощью генетически кодируемых кальциевых индикаторов в мозге различных модельных объектов *in vivo*. Обзор литературы написан ясно, хорошим научным языком, широко охватывает материал, включая самые современные публикации, и дает полное представление о проблемах и задачах в данной области исследований.

В разделе «Материалы и методы» подробно и грамотно описаны используемые в работе методики. Автор демонстрирует использование широкого арсенала современных методов биохимии, молекулярной и клеточной биологии, такие как: молекулярное клонирование, выделение и очистка рекомбинантных белков, выделение и культивирование нейронов мыши, конфокальная флуоресцентная микроскопия и прижизненная визуализация активности нейронов. Методический уровень диссертации, безусловно, заслуживает высокой оценки.

Главу «Результаты и обсуждение» можно разделить на две части. Первая часть посвящена разработке и характеристике кальциевого индикатора NTnC. Принципиально новым подходом, предложенным в диссертационной работе Барыкиной Н.В., является использование С-концевого домена тропонина С в качестве кальций-связывающего домена при разработке индикатора на основе одного флуоресцентного белка. Во-первых, тропонин С – это белок из мышечной ткани, он не имеет белков-партнеров в нейронах. Во-вторых, С-концевой домен тропонина С связывает два иона кальция, а не четыре, как полноразмерные тропонин С и кальмодулин. Также полностью обоснован выбор флуоресцентной части, белка mNeonGreen, яркость которого в 3 раза выше яркости белка EGFP. Для создания индикатора автор вставляла последовательность С-концевого домена тропонина С в последовательность флуоресцентной части; кальций-связывающую и

флуоресцентную части соединяли рандомизированными линкерами. Окончательный вариант индикатора был получен после оптимизации линкеров, нескольких раундов случайного мутагенеза и отбора клонов в клетках *E.coli*. Созданный индикатор NTnC обладает высоким сродством к ионам кальция, а его максимальная яркость на 60% выше яркости контрольного индикатора GCaMP6. Обратный фенотип индикатора NTnC облегчает визуализацию нейронов в состоянии покоя. Индикатор NTnC был опробован при мониторинге нейрональной активности в мозге свободноподвижных мышей. С помощью предложенного дизайна также были созданы индикаторы iYTnC и iYTnC2 путем замены флуоресцентного домена на желтый флуоресцентный белок EYFP. Индикатор iYTnC2 обладает повышенным ответом на изменение концентрации ионов кальция и большей скоростью диссоциации ионов кальция по сравнению с индикатором NTnC. Автору удалось зарегистрировать активность нейронов зрительной коры мозга свободноподвижных животных с помощью индикатора iYTnC2.

Во второй части главы «Результаты и обсуждение» диссертационной работы Барыкиной Н.В. предложен еще один оригинальный подход к созданию индикаторов. Автор использовала кальций-связывающие домены из организмов из царства грибов, а не животных, для создания кальциевого индикатора FGCaMP. Для его создания автор проанализировала последовательности кальций-связывающих белков нескольких видов грибов и дрожжей. FGCaMP обладает рациометрическим фенотипом и полностью мобилен в цитоплазме клеток HeLa при физиологических концентрациях ионов кальция. Путем анализа кристаллической структуры индикатора FGCaMP были найдены позиции, замена которых в широком диапазоне меняет сродство индикатора к ионам кальция. Также путем случайного и рационального мутагенеза Барыкина Н.В. разработала улучшенные версии индикатора FGCaMP с монофазной кривой связывания ионов кальция и увеличенным контрастом. Улучшенные версии были проэкспрессированы в культуре нейронов и позволили наблюдать спонтанную активность с динамическим диапазоном, близким к динамическому диапазону контрольного кальциевого индикатора R-GECO1.

Материалы диссертационной работы Барыкиной Н.В. опубликованы в трех статьях в международных рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, и представлены в 8 тезисах докладов на российских и международных конференциях.

В диссертационной работе представлен значительный по объему, новизне, теоретической и практической значимости материал. Достоверность описанных в диссертации результатов не вызывает сомнений. Результаты диссертации полностью

отражены в публикациях автора, содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы.

В работе присутствует небольшое количество грамматических ошибок и опечаток. На рисунках 3.21 и 3.22 в качестве контроля отмечен индикатор R-GECO, однако, непонятно, какой именно вариант этого красного индикатора использовали. Из замечаний можно также отметить недостаточную обоснованность использования кальциевых индикаторов GCaMP6s и GCaMP6f в качестве контролей для разработанных автором индикаторов.

Указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация Барыкиной Натальи Викторовны «Разработка новых генетически кодируемых флуоресцентных кальциевых индикаторов для визуализации нейронов» соответствует критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, а ее автор заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия.

Официальный оппонент  
заведующей лабораторией  
физической биохимии ФГУ  
«Федеральный исследовательский центр  
Фундаментальные основы биотехнологии» РАН,  
доктор химических наук, профессор

Александр Павлович Савицкий

30.11.18

119071, Москва, Ленинский проспект, д.33, корп. 2

Тел: +7 (495) 954-87-25 161

Email: apsavitsky@inbi.ras.ru

Подпись Савицкого А.П. удостоверяю

Ученый секретарь ученого совета  
ФИЦ Биотехнологии РАН, к.б.н.



Орловский А.Ф.