

**Заключение диссертационного совета МГУ.02.03
по диссертации на соискание учёной степени кандидата химических наук**

Решение диссертационного совета от «11» декабря 2018 г. № 16

О присуждении Барыкиной Натальи Викторовне, гражданке РФ,
учёной степени кандидата химических наук.

Диссертация «Разработка новых генетически кодируемых флуоресцентных кальциевых индикаторов для визуализации активности нейронов» по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия принята к защите диссертационным советом 7 ноября 2018 г., протокол № 13.

Соискатель Барыкина Наталья Викторовна, 1987 года рождения, в 2009 году окончила биологический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова и в 2011 году завершила обучение в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН.

Соискатель работает в должности инженера лаборатории стволовых клеток мозга института нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий (ИНБИКСТ) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)» с 2012 года по настоящее время.

Диссертация выполнена в лаборатории стволовых клеток мозга института нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий (ИНБИКСТ) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)».

Научный руководитель:

Субач Федор Васильевич – кандидат химических наук, старший научный сотрудник лаборатории стволовых клеток мозга института нано-, био-, информационных, когнитивных и социогуманитарных наук и технологий (ИНБИКСТ) Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)»;

Официальные оппоненты:

Готтих Марина Борисовна – доктор химических наук, профессор, главный

научный сотрудник отдела химии нуклеиновых кислот Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»;

Савицкий Александр Павлович – доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией физической биохимии Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН»;

Мишин Александр Сергеевич – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории биофотоники Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН

дали положительные отзывы на диссертацию.

Соискатель имеет 11 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 11 работ, из них 3 статьи, опубликованные в рецензируемых научных изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия

1. **Barykina N. V.**, Subach O. M., Doronin D. A., Sotskov V. P., Roshchina M. A., Kunitsyna T. A., Malyshev A. Y., Smirnov I. V., Azieva A. M., Sokolov I. S., Piatkevich K. D., Burtsev M. S., Varizhuk A. M., Pozmogova G. E., Anokhin K. V., Subach F. V., Enikolopov G. N. A new design for a green calcium indicator with a smaller size and a reduced number of calcium-binding sites // Scientific reports. – 2016. – V. 6. – P. 34447.
2. **Barykina N. V.**, Subach O. M., Piatkevich K. D., Jung E. E., Malyshev A. Y., Smirnov I. V., Bogorodskiy A. O., Borshchevskiy V. I., Varizhuk A. M., Pozmogova G. E., Boyden E. S., Anokhin K. V., Enikolopov G. N., Subach F. V. Green fluorescent genetically encoded calcium indicator based on calmodulin/M13-peptide from fungi // PloS one. – 2017. – V. 12. – No. 8. – P. e0183757.
3. Doronin D. A., **Barykina N. V.**, Subach O. M., Sotskov V. P., Plusnin V. V., Ivleva O. A., Isaakova E. A., Varizhuk A. M., Pozmogova G. E., Malyshev A. Y., Smirnov I. V., Piatkevich K. D., Anokhin K. V., Enikolopov G. N., Subach F. V. Genetically encoded calcium indicator with NTnC-like design and enhanced fluorescence contrast and kinetics // BMC biotechnology. – 2018. – V. 18. – No. 1. – P. 10.

Выбор официальных оппонентов обосновывался их высокой компетентностью и наличием публикаций в области биоорганической химии. Двое оппонентов являются докторами химических наук, один – кандидат биологических наук.

На автореферат диссертации поступило 3 дополнительных отзыва, все положительные.

Диссертационный совет отмечает, что представленная диссертация на соискание ученой степени кандидата химических наук является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований разработаны положения, совокупность которых можно квалифицировать как научные достижения.

Предложены новые подходы по разработке генетически кодируемых кальциевых индикаторов, которые основаны на использовании в качестве кальций-связывающих частей генетически кодируемых кальциевых индикаторов С-концевого домена тропонина С из мышечной ткани и кальций-связывающих доменов из грибов *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus*. С-концевой домен тропонина С из мышечной ткани связывает два иона кальция, а не четыре, в отличие от входящих в состав кальциевых индикаторов полноразмерных тропонина С и кальмодулина, и не имеет белков-партнеров в нейронах, что минимизирует влияние разработанных на его основе кальциевых индикаторов на жизнедеятельность нейронов.

При помощи предложенных подходов разработано два генетически кодируемых кальциевых индикатора на основе С-концевого домена тропонина С, NTnC и iYTnC2, и один индикатор на основе кальмодулина/M13-пептида из грибов рода *Aspergillus*. Изучение биохимических свойств полученных индикаторов показало, что NTnC обладает повышенной яркостью и высоким сродством к ионам кальция, а iYTnC2 с большим контрастом и высокой скоростью связывания/диссоциации взаимодействует с ионами кальция. Разработан кальциевый индикатор FGCaMP на основе кальций-связывающих частей из грибов. Показана применимость всех разработанных кальциевых индикаторов для визуализации активности нейронов *in vivo*. С помощью анализа кристаллической структуры индикатора FGCaMP, а также с помощью случайного и направленного мутагенеза разработаны версии индикатора FGCaMP с улучшенным контрастом и повышенным сродством к ионам кальция.

Диссертация представляет собой самостоятельное законченное исследование, обладающее внутренним единством. Положения, выносимые на защиту, содержат новые научные результаты и свидетельствуют о личном вкладе автора в науку:

1. Предложенный оригинальный подход по использованию С-концевого домена тропонина С и одного флуоресцентного белка mNeonGreen позволяет разработать новый генетически кодируемый кальциевый индикатор NTnC, применимый для визуализации активности нейронов мозга.
2. Замена флуоресцентного белка mNeonGreen в индикаторе NTnC на EYFP приводит к получению NTnC-подобного кальциевого индикатора iYTnC2 с большим динамическим диапазоном и увеличенной скоростью диссоциации ионов кальция.

3. Предложенный оригинальный подход по использованию кальмодулина и киназы из грибов *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus* позволяет разработать новый радиометрический генетически кодируемый кальциевый индикатор FGCaMP для визуализации активности нейронов мозга.
4. Замена ключевых аминокислотных остатков в позициях T3, L4, H5, I8, D9 и T10 киназы и D78, T79 и N97 кальмодулина, найденных с помощью анализа кристаллической структуры FGCaMP, влияет на контраст и сродство индикатора FGCaMP к ионам кальция.

На заседании 11 декабря 2018 года диссертационный совет принял решение присудить Барыкиной Наталье Викторовне ученую степень кандидата химических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 14 человек, из них 13 докторов наук, участвовавших в заседании, из 18 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – 14, против – 0, недействительных бюллетеней – 0.

Председатель
диссертационного совета МГУ.02.03
д.х.н., профессор, академик РАН

Ученый секретарь
диссертационного совета МГУ.02.03
к.х.н., доцент

11 декабря 2018 г.



Богданов А.А.



Смирнова И.Г.