

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

Само название науки нейробиологии говорит, что главными объектами ее изучения служат нервные клетки – нейроны, из которых состоит вся нервная система. Связи между нейронами объединяют их в функциональные группы, обрабатывающие информацию и, в конечном счете, определяющие поведение каждого живого существа. Понятно, что для исследования связей между нейронами в живом организме необходимо иметь определенный набор инструментов, качество которых во многом и определяет возможность получения точной и достоверной информации о взаимодействии нейронов и их роли в таких процессах, как пластичность, сенсомоторная интеграция, память и обучение. Одним из таких инструментов являются генетически кодируемые кальциевые индикаторы (ГККИ). Дело в том, что в процессе функционирования мозга происходит существенное изменение концентрации ионов кальция в цитоплазме нейронов, ГККИ позволяют наблюдать за этим процессом и, соответственно, исследовать активность мозга *in vivo*. Все используемые в настоящее время ГККИ – это химерные белки, которые состоят из Ca^{2+} -связывающей части и флуоресцентной частей, причем в качестве Ca^{2+} -связывающей компоненты используют кальмодулин или тропонин С из позвоночных животных. Каждый из этих типов индикаторов имеет свои недостатки. Все ранее разработанные кальциевые индикаторы, в состав которых входит тропонин С, состоят из двух флуоресцентных белков, и механизм их действия основан на переносе энергии FRET. Такие ГККИ требуют сложного оборудования для детекции флуоресцентного сигнала донора и акцептора. Последовательность белка кальмодулина идентична у всех позвоночных животных, в результате ГККИ на его основе могут

взаимодействовать с компонентами нейронов животных, что снижает функциональность как индикаторов, так и клеток. Важность и актуальность диссертационной работы Барыкиной Н.В. определяется самой постановкой задачи: разработать новые генетически кодируемые кальциевые индикаторы на основе Ca^{2+} -связывающего белка тропонина С и одного флуоресцентного белка, а также на основе Ca^{2+} -связывающего белка кальмодулина из грибов.

Диссертация Барыкиной Н.В. построена по стандартному принципу и включает следующие разделы: введение, обзор литературы, экспериментальную часть, результаты и обсуждение, выводы и список литературы, включающий 205 ссылок. Содержание диссертации полностью соответствует специальности.

Во введении очень четко и конкретно описаны актуальность исследования, его научная новизна, практическая ценность, а также цель и задачи диссертационной работы. Обзор данных литературы посвящен описанию полученных к настоящему времени ГККИ и самым непосредственным образом связан с темой диссертации. В обзоре коротко рассматривается роль ионов кальция в функционировании нейронов. Далее описываются основные типы ГККИ и механизм их действия, а также подходы к визуализации токов ионов кальция в разных организмах и проблемы, возникающие при использовании кальциевых индикаторов *ex vivo* и *in vivo*. Обзор написан хорошим литературным языком, с интересом читается и помогает читателю лучше понять выбор направления исследований и значимость проделанной диссертантом работы.

В разделе «Материалы и Методы» четко и подробно описаны многочисленные методики, использованные Барыкиной Н.В. в своей работе. Необходимо сразу отметить, что диссертант использовала широкий спектр самых современных физико-химических и биохимических методов, необходимых для получения рекомбинантных белков и исследования их флуоресцентных характеристик, культивирования про- и эукариотических клеток, работы с нейрональными культурами, кристаллизации белков. Надо

также подчеркнуть, что диссертант в своей работе не ограничилась изучением созданных ею ГККИ в культурах клеток, но и активно участвовала в визуализации активности нейронов в мозге мыши и личинки *Danio rerio*.

Раздел «Результаты и их обсуждение» по объему представляет собой половину всей диссертации и состоит из двух больших подразделов. Первый из них посвящен разработке и характеристике генетически кодируемых кальциевых индикаторов на основе С-концевого домена белка тропонина С из мускулатуры плавательного пузыря рыбы-жабы *Opsanus tau*, который не имеет белков-партнеров в нейронах млекопитающих и одного флуоресцентного белка. В качестве флуоресцентной части был выбран новый флуоресцентный белок mNeonGreen, яркость которого в 3 раза выше яркости белка GFP, входящего в состав широко используемых индикаторов семейства GCaMP. Надо сразу сказать, что Барыкиной Н.В. была проделана колоссальная работа по созданию и оптимизации структуры нового типа ГККИ. Так, нуклеотидную последовательность тропонина С из *O. tau* она синтезировала из олигонуклеотидов с помощью ПЦР с перекрывающимися фрагментами, затем вставляла ее в ген флуоресцентного белка mNeonGreen, так чтобы в полученном индикаторе Ca^{2+} -связывающая часть оказалась между аминокислотными остатками mNeonGreen 145 и 146, аналогично известному индикатору samgao0-1. Между Ca^{2+} -связывающей и флуоресцентной частями вставлялись линкеры длиной три произвольных аминокислоты. Полученную библиотеку генов индикатора с рандомизированными линкерами Барыкина Н.В. клонировала в бактериальную плазмиду и проводила скрининг с целью оптимизации последовательности линкеров между флуоресцентной и Ca^{2+} -связывающей частями. В результате скрининга был выбран один клон, который для улучшения яркости и контраста подвергали еще нескольким раундам случайного мутагенеза. В результате всей этой работы был получен окончательный вариант индикатора, названный NTnC (сокращенно от NeonGreen Troponin C). Надо отметить, что такой же колоссальный набор операций диссертант проводила для создания и других индикаторов.

Разработанный индикатор NTnС обладал маленьким размером, повышенной яркостью и, в отличие от кальциевых индикаторов семейства GCaMP, связывал два иона кальция, а не четыре. Таким образом, Барыкиной Н.В. удалось разработать и охарактеризовать кальциевый индикатор NTnС с новым дизайном на основе С-концевого домена тропонина С и одного флуоресцентного белка mNeonGreen *in vitro* и *ex vivo*. С помощью этого индикатора она визуализировала кальциевую активность в мозге мыши в ответ на зрительную стимуляцию, а также спонтанную активность в мозге свободноподвижного животного с установленным минимикроскопом nVista HD. Однако диссертант решила, что индикатор NTnС имеет ограниченный контраст в ответ на изменение концентрации ионов Ca^{2+} , что может затруднять визуализацию активности нейронов *in vivo*. По этой причине она заменила флуоресцентный белок mNeonGreen на EYFP, так как ранее на основе EYFP был разработан кальциевый индикатор camgargo-1 с контрастом выше, чем у индикатора NTnС. В результате был создан кальциевый индикатор iYnС2, обладающий увеличенным динамическим диапазоном и более быстрой скоростью диссоциации ионов Ca^{2+} *in vitro* по сравнению с NTnС. Этот индикатор позволил Барыкиной Н.В. успешно визуализировать спонтанную активность нейронов в мозге мыши *in vivo*.

Во втором подразделе описана разработка и характеристика кальциевого индикатора на основе кальмодулина и M13-подобного пептида из царства грибов. Выбор именно такого источника Ca^{2+} -связывающей части индикатора Барыкина Н.В. обосновала тем, что белки грибов по своей структуре достаточно далеки от аналогичных белков позвоночных, что позволяет избежать взаимодействия индикатора с компонентами внутри клетки мыши или рыбы и, соответственно, создать индикатор с новыми свойствами. Для создания такого индикатора был проанализирован ряд нуклеотидных последовательностей кальмодулина и M13-подобного пептида из двух видов грибов *Aspergillus niger* и *Aspergillus fumigatus* и одного вида дрожжей *Komagataella pastoris*, гомологичных Ca^{2+} -связывающим белкам позвоночных.

В качестве флуоресцентной части использовали белок *cpEGFP* или *mNeonGreen*. Всего было создано восемь библиотек генов индикатора с разными Ca^{2+} -связывающими и флуоресцентными частями. В результате работы по отбору клонов, оптимизации и мутагенеза и отбора на яркость и контраст был получен ГККИ, названный FGCaMP (сокращенно от *fungi green CaM-based protein*). Проведенная Барыкиной Н.В. работа по характеристике свойств индикатора FGCaMP показала, что он обладает ратиометрическим фенотипом и, в отличие от индикаторов на основе кальмодулина и киназы из позвоночных животных, мобилен в цитоплазме клеток млекопитающих, что свидетельствует об отсутствии взаимодействия индикатора FGCaMP с белками клетки. В работе также показана применимость индикатора FGCaMP для визуализации активности нейронов в культуре и в модели рыбок *Danio rerio in vivo*. В заключительной части работы Барыкиной Н.В. была получена кристаллическая структура индикатора FGCaMP и на основе ее анализа найдены позиции в кальмодулине *A. niger* и M13-подобном пептиде из киназы *A. fumigatus*, замена которых позволяет варьировать контраст и сродство индикатора FGCaMP к ионам Ca^{2+} .

Необходимо отметить, что все указанные выше результаты являются оригинальными и ярко отражают новизну данной работы. Диссертация Барыкиной Н.В. является научно-квалификационной работой, в которой впервые предложено два совершенно новых типа ГККИ. Эти кальциевые индикаторы могут быть использованы не только для визуализации кальциевой активности нейронов и изучения работы мозга различных живых организмах, но и для мониторинга изменений концентрации ионов кальция в других клетках, например, раковых HeLa и стволовых НЕК. Предложенные оригинальные подходы по разработке и оптимизации свойств кальциевых индикаторов являются универсальными и могут быть использованы для разработки индикаторов на другие низкомолекулярные вещества. Анализ кристаллических структур полученных Барыкиной Н.В. кальциевых индикаторов, а также полученные на их основе мутанты позволят в

дальнейшем разрабатывать новые ГККИ с улучшенными характеристиками. Работа представляет собой целостное и завершённое научное исследование, выполненное на очень высоком экспериментальном уровне. Результаты работы изложены чётко и ясно. Сделанные выводы обоснованы и подтверждаются полученными экспериментальными данными.

Материалы диссертационной работы опубликованы в 3 статьях в рецензируемых журналах, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ по специальности 02.00.10 – биоорганическая химия, и 8 тезисах докладов на престижных российских и международных конференциях. Публикации по итогам работы и автореферат в полной мере отражают основное содержание диссертации. Все выводы диссертации хорошо обоснованы и их достоверность не вызывает сомнений.

Подводя итог, необходимо отметить высокое качество не только экспериментальной работы диссертанта, но и подготовки диссертации. Вся работа очень хорошо структурирована, снабжена четкими и аккуратными рисунками и понятными схемами. В работе практически отсутствуют стилистические и грамматические ошибки и опечатки. Из замечаний можно отметить только недостаточно обоснованный в работе выбор длины линкеров между Ca^{2+} -связывающей и флуоресцентной частями индикаторов: почему-то в случае индикатора NTnC используются линкеры из 3-х аминокислот, а в случае его аналога - индикатора iTnC N-конец Ca^{2+} -связывающей части соединяли с флуоресцентной частью линкером длиной три произвольных аминокислоты, а С-конец – линкером в 2 аминокислоты.

Вместе с тем, указанные недочеты никоим образом не умаляют значимости диссертационного исследования и не снижают общего высокого уровня работы, которая, несомненно, является высококлассным научным исследованием.

Диссертация Барыкиной Н.В. 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 Барыкина Н.В. заслуживает присуждения степени кандидата химических наук по специальности 02.00.10 - биоорганическая химия.

Официальный оппонент:
главный научный сотрудник
отдела химии нуклеиновых кислот
Научно-исследовательского института
физико-химической биологии
имени А.Н.Белозерского
Московского государственного университета
имени М.В. Ломоносова



/Готтих М.Б./

27.11.2018

Контактные данные:
телефон: +7 495 939 5407
адрес электронной почты: gottikh@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой оппонентом защищена диссертация:
02.00.10 – биоорганическая химия

Адрес места работы:
119991 Москва, ул. Ленинские горы, дом 1, строение 40.
НИИ ФХБ имени А.Н.Белозерского МГУ
Тел.: +7 (495) 939-53-59; e-mail: fxb@genebee.msu.su

Подпись Готтих М.Б. заверяю:

Зав. канцелярией НИИ ФХБ
имени А.Н.Белозерского МГУ



/Н.Н. Сидорова/