

Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»
Институт биохимии им. А.Н. Баха
(ИНБИ РАН)

119071 Россия, Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2. Тел.: (495) 954-5283; <http://www.inbi.ras.ru>; e-mail: inbi@inbi.ras.ru

12.04.2017 № 163-217-1-324 от 19.04.17
На № . 163-217.1-324 от 19.04.17

“УТВЕРЖДАЮ”

Директор
Федерального исследовательского центра РАН
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Чл.-корр. РАН, профессор, д.х.н.



ПОПОВ В.О.

“12” апреля 2017г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию **Ермаковой Юлии Геннадьевны** на тему «Новые оптогенетические технологии в активации и визуализации процессов в нейронных сетях», представленную на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности Молекулярная биология - 03.01.03.

Синтетическая биология представляет собой область исследований, в которой принципы генной инженерии используются для создания живых систем с заданными свойствами. Одним из центральных принципов синтетической биологии является создание нового свойства системы за счет переноса в неё генов эволюционно далекого организма или химерных белков. Этот подход ранее позволил разработать широкую панель молекулярных методов стимуляции и визуализации процессов *in vivo*. Синтетическая биология позволяет создавать новые методики стимуляции внутриклеточных процессов, а также новые репортерные молекулы, флуоресцентные генетически-кодируемые сенсоры, способные детектировать динамику различных внутриклеточных лигандов, таких как катионы кальция, активные формы кислорода, продукты метаболизма жирных кислот, соотношение АТФ/АДФ, НАДН/НАДФ, а также окисленного и восстановленного глутатиона. Изучение взаимного влияния различных сигнальных путей внутри клетки необходимо для понимания процессов, происходящих в клетках в норме и при патологиях.

Диссертационная работа Ермаковой Ю. Г. посвящена важной теме – усовершенствованию генетически кодируемого сенсора HyPer для детекции физиологических концентраций пероксида водорода с получением его красной версии HyPerRed, а также развитию технологии активации клеток с помощью термочувствительных каналов змей TRPA1 и инфракрасного излучения (980-1450 нм) с оптоволоконной системой доставки излучения.

Спектральные и кинетические характеристики такого инструмента, как HyPerRed, полученного автором, позволяет комбинировать этот сенсор совместно с генетически кодируемыми сенсорами со спектральными характеристиками зеленых, циановых и желтых флуоресцентных белков, и более детально изучить динамику продукции и инактивации пероксида водорода в живых системах.

Для получения HyPerRed автор заменил ген кругового пермутанта желтого флуоресцентного белка в структуре сенсора HyPer на круговой пермутант красного флуоресцентного белка *srnApple* из красного генетически-кодируемого сенсора для детекции катионов кальция R-GECO1.1, а в дальнейшем была проведена работа по оптимизации линкерных участков между чувствительным и флуоресцентным доменами сенсора. Автором была проведена работа по характеристике выделенного рекомбинантного белка HyPerRed, очищенного препарата белка *in vitro*, а также при экспрессии в цитоплазме клеток прокариот и эукариот. Было продемонстрировано, что кинетика чувствительности к пероксиду водорода, pH-зависимость флуоресценции, а также кинетика окисления и восстановления сенсора HyPerRed незначимо отличается от этих параметров для сенсора HyPer.

HyPerRed расширяет панель сенсоров для детекции пероксида водорода и может быть использован в сочетании с большинством существующих сенсоров, основанных на желтых и зеленых флуоресцентных белках. С помощью HyPerRed автор обнаружил локальный, кратковременный всплеск продукции пероксида водорода в матриксе митохондрий, при котором не происходит распространения пероксида водорода в межмембранное пространство или цитоплазму клетки при стимуляции клеток тапсигаргином, ингибитором АТФазы эндоплазматического ретикулума. Этот эксперимент продемонстрировал совместное применение спектрально различных сенсоров для детекции пероксида водорода (HyPer/HyPer2 и HyPerRed) в различных локализациях, что позволяет детектировать распространение пероксида водорода одновременно в нескольких компартментах клеток.

Вторая часть работы была посвящена оптимизации применения термоактивируемых каналов змей TRPA1 (caTRPA1, eo1TRPA1). TRPA1 змей были выбраны как инструменты термогенетики. Эти каналы обладают высокой чувствительностью к температуре, т.к. в природе змеи используют их для ориентации в процессе охоты в ночное время, что позволило предположить высокую скорость активации этих белков в образцах.

Было установлено, что при экспрессии в клетках HEK293 и нейронах мышцы TRPA1 наблюдается эффект ингибирования активности TRPA1, который снимается инкубацией клеток в течение часа на подпороговой температуре. Данный эффект позволяет использовать TRPA1 для большого количества объектов, не нарушая их физиологических условий выращивания.

Была описана кинетика активации терморецепторов TRPA1, установлено, что при одинаковых параметрах длительности и мощности импульса кинетика развития кальциевого ответа клеток в точности воспроизводится, а сама кинетика стимуляция описывается температурной константой порога, индивидуальной для каждого канала.

При изучении электрофизиологических характеристик работы TRPA1 на нейронах мышцы было установлено, что TRPA1 змей активируются в течение первой мсек с момента начала стимуляции, а также способны воспроизводить частоту стимулирующего импульса, что открывает новые возможности для использования TRPA1 для регулируемого управления деполяризацией и кальциевым метаболизмом клеток, а также для декодирования сигналов в клетках.

В качестве примера *in vivo* стимуляции с помощью TRPA1 было изучено а поведение избегания у 2х-дневных личинок *Danio rerio*. Была показана высокая эффективность и специфичность данной стимуляции, а также отсутствие токсического эффекта экспрессии caTRPA1 в личинках *Danio rerio* без нарушения стандартных условий их выращивания.

Данная работа объединяет в себе два больших раздела развития технологий: создание новых генетически-кодируемых сенсоров и разработку способов активации клеток. Главными результатами данной работы является создание нового красного генетически-кодируемого сенсора для детекции пероксида водорода HyPerRed, а также разработка *in vivo* метода термогенетики для стимуляции клеток с помощью термоактивируемых каналов TRPA1 змей, детальное описание функционирования и активации которых в различных биологических моделях позволяют расширить применение термогенетики в современной науке.

По работе есть несколько не влияющих на полученные результаты замечаний:

В эксперименте по определению константы псевдопервого порядка реакции окисления сенсоров линии HyPerRed автору следовало бы провести дополнительную проверку полученных результатов, а для представленных данных ввести более подходящий термин «кажущаяся константа скорости реакции псевдопервого порядка реакции», т.к. в связи с ограничениями, связанными с диффузией пероксида водорода через клеточную мембрану и внутри цитоплазмы клетки, выбранная экспериментальная система позволяет проводить только относительное сравнение используемых сенсоров.

Также необходимо протестировать сенсор HyPerRed на чувствительность к синглетному кислороду, чтобы дополнить данные о его специфичности.

В случае презентации данных термогенетики стоит более детально указывать параметры стимуляции для каждого эксперимента, т.к. они отличаются в различных экспериментах.

Полученные результаты обладают несомненной значимостью для науки, медицины и фармакологии. Инструменты, разработанные автором, могут использоваться в фундаментальных научных исследованиях, а также способствовать развитию методов терапии нейродегенеративных заболеваний, а также, в случае термогенетики, служить созданию модели инфаркта миокарда, панкреатических островков Лангерганса, функционирование которых часто нарушается при диабете 1го типа для дальнейшего тестирования лекарственных препаратов.

Диссертация написана по традиционному плану - работа состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 229 ссылок. Диссертация изложена на 135 страницах и содержит 41 рисунок.

Материал диссертации изложен последовательно, результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют и логически развивают положения, установленные автором ранее. Исследование проведено на высоком методическом уровне, проделан большой объем работы. Надежность и достоверность полученных данных обеспечивается квалифицированным применением современных молекулярно-биологических, биохимических и спектральных методов исследований. Сделанные выводы хорошо аргументированы. Диссертационная работа носит полноценный и заверченный характер как в научном плане, так и в оформлении. Результаты диссертационной работы докладывались на международных и российских научных конференциях и опубликованы в ведущих российских и зарубежных журналах с высокими индексами цитирования и высокими импакт-факторами, в том числе Nature и

Nature Communications (всего 7 научных статей, 1 патент РФ, 7 докладов на конференциях, а также 1 научная статья находится в печати).

Обзор литературы адекватно отражает положение дел в области создания генетически-кодируемых сенсоров, а также развитие разнообразных подходов к модулированию клеточной активности с помощью белков-рецепторов: хемогенетики, оптогенетики и термогенетики.

Цели работы в создании и применении генетически кодируемого флуоресцентного сенсора для детекции пероксида водорода HyPerRed, обладающего спектральными свойствами красных флуоресцентных белков, а также в разработке методов активации клеток с помощью термочувствительных белков TRPA1 змей, соответствуют поставленным задачам. Раздел, посвященный методам исследования, содержит подробное описание методов молекулярной биологии и микроскопии, а также работы с животными, и достаточно полно отражает спектр использованных методик. Результаты исследования полностью соответствуют поставленным задачам и выводам, а их изложение в диссертации - изложению в автореферате. В целом, диссертационная работа соответствует заявленной специальности Молекулярная биология - 03.01.03.

Такие результаты исследования, как создание и применение генетически кодируемого флуоресцентного сенсора для детекции пероксида водорода HyPerRed в детекции митохондриальной продукции пероксида водорода, а также в разработке методов активации клеток с помощью термочувствительных белков TRPA1 змей, можно квалифицировать как научные достижения, имеющие как фундаментальное, так и прикладное значение для молекулярной биологии, биомедицины и фармакологии.

Результаты исследования могут быть использованы в различных институтах РАН и РАНХ (Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институт биологии гена РАН, Институт биологии развития им. Н.К.Кольцова РАН,

Институт молекулярной генетики РАН, Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Институт общей генетики им. Н.И.Вавилова РАН, Институт цитологии РАН, Институт цитологии и генетики СО РАН), на биологическом и химическом факультетах Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и Санкт-Петербургского государственного университета, а также других профильных институтах и университетах России и всего мира.

Высказанные замечания не умаляют значения полученных в работе результатов. Данная диссертационная работа полностью соответствует требованиям "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от

24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335, в ред. Постановления Правительства РФ от 02.08.2016 г. №748), а ее автор, Ермакова Ю.Г., заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология».

Отзыв обсужден и утвержден на семинаре лаборатории физической биохимии Федерального государственного учреждения Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук, протокол №1 от 7 апреля 2017 года.

Заведующий лабораторией физической биохимии,
доктор химических наук, профессор

12 апреля 2017 г.



Мах
Савицкий А.П.

