

## ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Ермаковой Юлии Геннадьевны «Новые оптогенетические технологии в активации и визуализации процессов в нейронных сетях», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03. – «Молекулярная биология»

### Актуальность исследования

Значительный прогресс, наблюдаемый в последние десятилетия в физиологических науках вообще и в нейрофизиологии в частности, в большой степени определяется появлением и внедрением в экспериментальную практику различных генетически кодируемых молекулярных инструментов. Первая часть настоящей диссертационной работы посвящена созданию нового генетически кодируемого сенсора пероксида водорода, флуоресцирующего в красной области спектра. Подобный сенсор может использоваться совместно с другими генетически кодируемыми сенсорами, часто флуоресцирующими в зеленой области спектра. Это значительно расширяет возможности проведения различных физиологических экспериментов, что определяет актуальность первой части настоящей работы.

Оптогенетика, которую можно определить как управление при помощи света активностью нейронов за счет экспрессии в них светоактивируемых белков, является мощным инструментом в нейрофизиологических исследованиях, определившим значительный прогресс в изучении функций мозга в последнюю декаду. Прогресс оптогенетики особенно сильно зависит от разработки новых светоактивируемых белков. Применение уже имеющихся светоактивируемых белков в значительной степени ограничено небольшой глубиной проникновения света, используемого для их активации, а также сравнительно небольшой ионной проводимостью индивидуальных каналов. Чтобы обойти данное ограничение, автором было отработано использование для активации нейронов TRPA термочаналов змей, активирующихся инфракрасным светом, способным проникать на

значительную глубину в ткани мозга, а также характеризующихся значительной ионной проводимостью. Разработанный инструмент позволит проводить *in vivo* эксперименты с неинвазивной стимуляцией нейронов, расположенных даже в глубинных структурах мозга, по крайней мере, на пойкилотермных животных, что открывает новые возможности для нейробиологических исследований. Первый такой эксперимент уже был выполнен в рамках данной диссертационной работы на модельном объекте *Danio rerio*.

### **Структура, объем и основные результаты работы**

Структура диссертационной работы соответствует общепринятым стандартам. Работа изложена на 135 страницах, состоит из введения, обзора литературы, методического раздела, результатов и их обсуждения, а также списка цитируемой литературы из 299 ссылок, снабжена богатым иллюстративным материалом. Материалы изложены логически, последовательно и доступно для понимания специалистам широкого профиля в области биологии.

Во введении автор раскрывает актуальность проведенного исследования и подводит к постановке задачи. Затем по пунктам описываются цели и задачи исследования.

В «Обзоре литературы» автор подробно рассматривает имеющиеся представления о структуре и функции известных флуоресцентных белков и созданных на их основе генетически кодируемых флуоресцентных сенсорах. В отдельных разделах описываются современные методы оптогенетической и хемогенетической стимуляции нейронных сетей. Обзор хорошо иллюстрирован и позволяет получить полноценное представление о рассматриваемой проблеме.

В разделе «Материалы и методы» подробно излагаются использованные в работе методы исследований. Стоит отметить широкий спектр самых современных молекулярно-биологических,

электрофизиологических, биохимических и спектральных методов, которые применяются в работе.

Изложение результатов работы совмещено с их обсуждением.

В первой части работы описывается получение нового генетически кодируемого сенсора для детекции пероксида водорода HyPerRed, обладающего спектром красных флуоресцентных белков. Данный сенсор был охарактеризован *in vitro* на рекомбинантной белке, а также при экспрессии в бактериальных клетках *E.coli* и в клетках Hela Kyoto. С применением разработанного сенсора было обнаружено локальное увеличение продукции пероксида водорода в матриксе митохондрий при ингибировании захвата кальция эндоплазматическим ретикулумом.

Во второй части работы описано применение термочаналов змей TRPA1 для активации клеток при помощи ИК и СВЧ излучения. Описаны функциональные и кинетические характеристики работы TRPA1 в клетках HEK293, нейронах мышцы в смешанной культуре эмбриональных нейронов и глиальных клеток, а также продемонстрировано применение TRPA1 для стимуляции поведения избегания у личинок *Danio in vivo*.

Охарактеризованные методы работы с TRPA1 и разработанные установки по их стимуляции позволяют применять TRPA1 для стимуляции различных типов клеток, а также областей мозга животных, что открывает новые возможности комбинации TRPA1 с инструментами оптогенетики.

Выводы работы четко сформулированы и вытекают из полученных в исследовании результатов.

### **Научная новизна исследования, полученных результатов, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации**

В работе впервые создан генетически кодируемый сенсор пероксида водорода HyPerRed, обладающий спектральными свойствами красных флуоресцентных белков. С применением созданного сенсора впервые была

показана продукция пероксида водорода в матриксе митохондрий при ингибировании АТФазы эндоплазматического ретикулаума.

Впервые отработана методика применения TRPA1 термочаналов змей для дистантной активации нейронов позвоночных при помощи инфракрасного света. Охарактеризованы кинетические и пороговые характеристики данных каналов. Впервые была проведена термогенетическая стимуляции сомато-сенсорных нейронов личинок *Danio in vivo*.

### **Теоретическая и практическая значимость**

Практическая значимость работы состоит в том, что разработанные автором новые молекулярные инструменты (красный сенсор для детекции уровня пероксида водорода внутри клеток и TRPA1 каналы для термогенетической стимуляции возбудимых клеток), вне всякого сомнения, найдут широкое применение в исследованиях в совершенно различных областях физиологии. Практическая значимость также подтверждается получением автором патента РФ на создание сенсора пероксида водорода HyPerRed. Теоретическая значимость работы определяется ее вкладом в развитие и совершенствование методов генной инженерии и молекулярного дизайна.

### **Степень обоснованности и достоверность полученных результатов, научных положений и выводов, сформулированных в диссертации**

Работа выполнена на высочайшем экспериментальном уровне и производит впечатление грамотного научного исследования. Полученные результаты хорошо проиллюстрированы и убедительно подтверждают сделанные автором выводы. Надежность и достоверность полученных данных обеспечивается квалифицированным применением современных молекулярно-биологических, электрофизиологических, биохимических и спектральных методов исследования. Там, где это необходимо, применены адекватные методы статистической обработки данных.

Следует отметить высокий уровень публикаций по теме диссертации. По материалам работы опубликовано семь статей в, без преувеличения, ведущих зарубежных научных изданиях (входящих в список журналов, рекомендованных ВАК РФ), причем одна из основных статей по теме диссертации, в которой Ермакова Ю.Г. является первым автором, опубликована в высокоимпактном зарубежном научном издании (Nature Communication, импакт-фактор 11.3), что свидетельствует о высоком научном уровне выполненной работы. Отдельные части работы докладывались на нескольких международных и отечественных конференциях.

В процессе прочтения работы у меня возникло несколько замечаний и вопросов, носящих, главным образом, дискуссионный характер.

**Замечания:**

1. В обзоре литературы природный светоактивируемый хлорный канал GtACR ошибочно отнесен к синтетическим производным каналоропсина2 (CHR2) с измененной ионной селективностью (стр. 36). Соответственно, не процитирована статья, описывающая открытие анионного канального родопсина GtACR (Govorunova et al., 2015/Science)
2. В описании результатов экспериментов с активацией TRPA1 каналов на культивируемых нейронах с использованием метода петч-клямпы (стр. 101) приведены только средние значения полученных величин без их стандартных ошибок (величина деполяризации и входящий ток в ответ на подпороговую стимуляцию нейронов). Также здесь не указано количество проведенных экспериментов. Кроме того, в этих экспериментах было бы уместно детально охарактеризовать кинетику трансмембранных токов, возникающих при активации TRPA1 каналов.

**Вопросы:**

1. Одним из посылов настоящей работы в части, касающейся разработки молекулярных инструментов термогенетики, является возможность

использования этих инструментов для проведения экспериментов *in vivo* на теплокровных животных, в частности на мышах и крысах. Однако здесь существует целый ряд ограничивающих факторов:

1) Как было показано в ряде работ, в частности в работе Мозера и соавт. (Moser et al., 1993/Science), при выполнении различных поведенческих и когнитивных тестов крысами происходит повышение температуры их мозга до значений 38.5 и более градусов, что превышает порог открытия каналов  $Ca^{2+}$ TRPA1, определенных в данной диссертационной работе как 37.9-38.5 градусов.

2) Автором было показано, что для правильной работы TRPA1 каналов требуется их предварительное инкубирование при подпороговых температурах в течение определенного времени. В частности, культивируемые нейроны непосредственно перед экспериментом в течение часа инкубировались при температуре 35.5°. Проведение подобной процедуры представляется несколько затруднительным в случае проведения экспериментов *in vivo*.

3) При открытии TRPA1 каналов происходит массиванный вход кальция внутрь клетки, что может значительно повлиять на функцию нейронов и вызывать эффект, отличный от эффекта собственно генерации потенциалов действия нервной клеткой.

4) Нагревание нервной ткани, требуемое для активации TRPA1 каналов, приводит к изменению некоторых электрофизиологических свойств нейронов, в частности изменению уровня спонтанной активности (Erickson et al., 1996/Exp Brain Res).

Как автор мог бы прокомментировать вышеизложенные моменты, которые необходимо учитывать при использовании TRPA1 каналов в экспериментах *in vivo* на теплокровных животных?

2. В экспериментах с одновременной внутриклеточной регистрацией  $Ca^{2+}$ TRPA1-экспрессирующих нейронов и оптической регистрацией кальциевого сигнала при помощи сенсора GCaMP6s (Рис. 38 А, Б) непонятно,

в какой степени регистрируемый кальциевый ответ является следствием входа ионов кальция через TRPA1 каналы, а в какой – через потенциал-зависимые кальцевые каналы, активируемые генерацией потенциала действия. Возникает вопрос: приводит ли к возникновению кальциевого ответа стимуляция нейрона инфракрасным лазером в режиме фиксации потенциала (как на Рис. 38Д), когда генерации потенциала действия не происходит? Различалась ли амплитуда кальциевого ответа на потенциал действия, вызванный инфракрасной стимуляцией TRPA1 каналов, и на внутриклеточно индуцированный потенциал действия?

Следует отметить, что вышеуказанные замечания никаким образом не снижают актуальность и значимость проведенной автором работы и носят в основном дискуссионный характер.

### **Заключение**

Диссертационная работа Ермаковой Юлии Геннадьевны актуальна с точки зрения научной тематики, соответствует заявленной теме и является логически завершенным исследованием, выполненным на современном экспериментальном уровне. Основные научные результаты диссертационной работы получены впервые и опубликованы в ведущих иностранных научных журналах. Достоверность и обоснованность полученных результатов, научных положений и выводов не вызывает сомнений.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации. В нем правильно отражены основные идеи и выводы диссертации, новизна и практическая значимость результатов исследований.

Таким образом, можно заключить, что по актуальности, новизне, уровню выполнения и научной значимости диссертационная работа Ермаковой Юлии Геннадьевны «Новые оптогенетические технологии в активации и визуализации процессов в нейронных сетях» соответствует требованиям "Положения 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».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,

профессор РАН,

ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук

Малышев Алексей Юрьевич

5 мая 2017 г.

Контактная информация:

Почтовый адрес: ИВНД и НФ РАН, Москва 117485, ул. Бутлерова, дом.5А

Тел.: (916) 540-6902 E-mail: malyshev@ihna.ru



Подпись т. Малышева А.Ю.  
УДОСТОВЕРЯЮ  
Зав. канц. ИВНД и НФ РАН Малышев А.Ю.