

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Ю.Г. Ермаковой «Новые оптогенетические технологии в активации и визуализации процессов в нейронных сетях», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.01.03 – молекулярная биология

В настоящее время оптогенетические технологии привлекают внимание многих ученых и пользуются большой популярностью. Эти технологии позволяют отслеживать изменение концентрации важных метаболитов в отдельных клетках, а также индуцировать различные физиологически важные процессы в отдельных клетках или даже в организме исследуемых животных. Нет сомнения в том, что бурное развитие опто- и термогенетических подходов позволит не только получить важную новую информацию о процессах, протекающих в живых клетках, но в обозримом будущем может быть использовано для решения сложных медицинских проблем. По этой причине актуальность диссертационной работы Ю.Г. Ермаковой, посвященной получению нового сенсора перекиси водорода и разработке новых термогенетических подходов, не вызывает сомнения.

Диссертационная работа состоит из двух частей. Первая часть диссертации Ю.Г. Ермаковой была посвящена разработке, получению и характеристике свойств нового сенсора перекиси водорода. При всех достоинствах ранее разработанного сенсора перекиси водорода HyPer оказалось, что это сенсор обладает и некоторыми недостатками. В частности, интенсивность флуоресценции и спектральные свойства этого сенсора не позволяли использовать его для исследования процессов, происходящих в толстых слоях тканей. По этой причине было желательным создать новый сенсор, обладающий более высокой интенсивностью флуоресценции и спектрами поглощения и флуоресценции в красной области спектра. Перепробовав в качестве флуоресцентного ядра несколько красных флуоресцентных белков (mKate, FusionRed, cpmApple) диссертант остановил свой выбор на белке cpmApple и после подбора соответствующих линкеров смог получить сенсор перекиси водорода с желаемыми параметрами флуоресценции. Оказалось, что новый сенсор, получивший обозначение HyPerRed не уступает старому сенсору HyPer ни по чувствительности, ни по специфичности, ни по интенсивности флуоресценции. Была проведена подробная характеристика физико-химических свойств нового сенсора, и было установлено, что Cys 199 играет ключевую роль в способности сенсора реагировать на изменение концентрации перекиси водорода. Эта часть работы производит очень сильное впечатление. Мелкие несущественные замечания касаются следующего. Концентрации перекиси водорода и сенсора выражаются то в нМ, то в *nM*, что затрудняет понимание текста, потому что обозначение *nM* может трактоваться как пикомолярная (а не наномолярная) концентрация. В подписи к рис. 2Б указывается, что титрование HyPerRed перекисью водорода проводили в присутствии 0,5 мМ мерпактоэтанола и при этом концентрация перекиси водорода не превышала 600 нМ. Одновременно с этим говорится (рис.2 Г), что добавление 1 мМ меркаптоэтанола к белку, обработанному 200 нМ перекиси водорода, обеспечивает полное восстановление белка. Вероятно, следовало каким-то образом пояснить эти кажущиеся мне несколько противоречивыми данные. Продолжая свое исследование, Ю.Г. Ермакова проанализировала способность HyPerRed регистрировать изменение концентрации перекиси водорода в эукариотических клетках. Было показано, что экспрессия HyPerRed в клетках HeLa Kyoto позволяет зарегистрировать добавление незначительных количеств перекиси водорода снаружи клеток. При этом добавление даже очень малых концентраций перекиси водорода (6 мкМ) снаружи сопровождается увеличением флуоресценции сенсора внутри клетки. В этом отношении новый сенсор не уступает, а по многим параметрам превосходит ранее созданный сенсор HyPer. Несомненный интерес представляют результаты по исследованию влияния эпидермального фактора роста на продукцию перекиси водорода в клетках HeLa Kyoto. В ходе этих экспериментов было показано, что добавление 100 нг/мл эпидермального фактора роста к клеткам сопровождается увеличением флуоресценции HyPerRed, отражающим увеличение внутриклеточной концентрации перекиси водорода. Первый раздел диссертации завершается разделом, в котором автор изучает динамику изменений концентрации перекиси водорода, соотношений окисленного и восстановленного глутатиона и изменений pH в различных компартментах одной клетки. В этом разделе в полной мере демонстрируются удивительные возможности современных оптогенетических подходов. На основе проведенных опытов делается вывод о том, что добавление тапсигаргина (ингибитора Са-АТФазы ретикулула) сопровождается увеличением концентрации перекиси водорода в матриксе

митохондрий и при этом образовавшаяся в матриксе митохондрий перекись водорода не переходит в цитозоль. Полученные результаты заслуживают самой высокой оценки и одновременно с этим вызывают вопросы, которые, возможно следовало обсудить. Во-первых, вероятно, было бы желательным объяснить механизм, с помощью которого повышение концентрации кальция в цитозоле может приводить к повышению концентрации перекиси водорода в матриксе митохондрий. Во-вторых, остается не очень понятным, почему перекись водорода легко проникает из цитозоля в матрикс митохондрий и одновременно с этим не способна выходить из матрикса митохондрий в цитозоль. Как бы то ни было, следует особо подчеркнуть, что полученные результаты заслуживают самой высокой оценки и убедительно демонстрируют все достоинства современной оптогенетических технологий.

Вторая часть диссертационной работы Ю.Г. Ермаковой посвящена разработке и внедрению новых термогенетических методов. Были получены меченые флуоресцентными белками mCherry, mNeonGreen белки термочувствительных каналов двух змей. Полученные конструкторы были встроены в клетки НЕК293, а также в нейроны кортикальной культуры. Было установлено, что стимуляция нейронов мыши лазерным пучком диаметр которого был сопоставим с размерами нейрона, сопровождается активацией термочувствительных каналов и изменением концентрации кальция. При этом частотная динамика изменения концентрации кальция совпадала с частотой импульсов лазера. Интересные и оригинальные результаты были также получены при встраивании термочувствительных каналов в нейроны мыши и соматосенсорные нейроны рыбки *Danio rerio*.

Завершая анализ диссертационной работы Ю.Г.Ермаковой, можно заключить, что это исследование посвящено интересной и важной проблеме, выполнено на очень высоком методическом уровне и содержит новые оригинальные результаты. Об очень высоком уровне проведенных исследований свидетельствует тот факт, что полученные результаты были опубликованы в самых высоко престижных научных журналах. Мне кажется, что анализ автореферата диссертации позволяет заключить, что рецензируемая работа соответствует требованиям к кандидатским диссертациям, выдвигаемым "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, Юлия Геннадьевна Ермакова, несомненно заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

Член-корреспондент РАН,
профессор кафедры биохимии
биологического факультета МГУ,
доктор биологических наук
по специальности 03.01.04 биохимия

Николай Борисович Гусев

Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва, 119234

Контактный телефон: 7-495-939-2747

E-mail: NBGusev@mail.ru

Биологический факультет Федерального Государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Ленинские Горы дом 1 корп. 12, Москва, 119234

Телефон: 8-495-939-27-76, Факс: 8-495-939-43-09

e-mail: info@mail.bio.msu.ru



Документовед биологического факультета МГУ

Почтовый адрес: Ленинские Горы дом 1 корп 12, Москва, 119234