

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

На правах рукописи

Ермакова Юлия Геннадьевна

**Новые оптогенетические технологии в активации и
визуализации процессов в нейронных сетях**

специальность – 03.01.03 – молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание учёной степени

кандидата биологических наук

Москва 2017

Работа выполнена в Лаборатории молекулярных технологий в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН).

Научный руководитель:

Белоусов Всеволод Вадимович, доктор биологических наук, профессор РАН.

Официальные оппоненты:

Малышев Алексей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор РАН, ведущий научный сотрудник Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии Российской академии наук.

Панчин Юрий Валентинович, доктор биологических наук, заведующий лабораторией Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской академии наук.

Ведущая организация: Федеральное государственное учреждение Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук.

Защита состоится «24» мая 2017 года в 10.00 на заседании диссертационного совета Д 002.019.01 при ИБХ РАН по адресу: 117997, Москва В-437, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке и на сайте www.ibch.ru ИБХ РАН.

Автореферат разослан « ___ » марта 2017 года.

Ученый секретарь диссертационного совета,

доктор физико-математических наук

В.А. Олейников



Общая характеристика работы

Актуальность проблемы. 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 позволил разработать широкую панель молекулярных методов стимуляции и визуализации процессов *in vivo*.

Генетически-кодируемые сенсоры являются одним из популярных способов детекции различных внутриклеточных лигандов, таких как пероксид водорода (H_2O_2), ионы кальция (Ca^{2+}), фосфорилированные производные глюкозы, инсулин, соотношения АТФ/АДФ, НАД⁺/НАДН, окисленного и восстановленного глутатиона (GSSG/GSH), а также активность ферментов, таких как каспазы, киназы и фосфорилазы. Но подавляющее большинство существующих сенсоров обладают спектральными свойствами зеленых или желтых флуоресцентных белков, что делает зачастую невозможным совместное использование нескольких сенсоров в одном эксперименте. Поскольку для детекции метаболических и сигнальных процессов в живых объектах имеет большое значение локализация сигнала, распределение которого может зависеть от индивидуальных особенностей объекта, создание новых и расширение панели существующих сенсоров позволит проводить совместную, многопараметрическую микроскопию нескольких сигналов в одном образце.

В первой части работы речь пойдет о модификации сенсора НуPer для детекции пероксида водорода с целью создания его версии, обладающей спектральными характеристиками красных флуоресцентных белков. Создание данного сенсора позволит расширить возможности многопараметрической микроскопии сигнальных окислительно-восстановительных процессов в клетках. Для изучения различных объектов биологии, таких как живые клетки, срезы мозга, животные *in vivo* не менее важно развитие методов стимуляции процессов в живых системах, т.к. они позволяют создавать регулируемые модели различных видов поведения, стимуляции различных видов передачи сигнала, метаболических процессов и паталогических процессов.

Существует множество подходов к регуляции клеточной активности с помощью различных химических соединений и белков. Многие белки, используемые для регуляции клеточных функций, представляют собой рецепторы, помпы и ионные каналы. Физическая природа активации выбранного белка определяет не только метод,

используемый для его стимуляции в модели, но и ограничения определенного подхода. Так химическая стимуляция рецепторов с помощью введения метаболитных активаторов ограничена диффузией и зачастую приводит к медленной и пролонгированной активации выбранных рецепторов, активация видимым светом связана с ограничениями по доставке излучения и поглощением тканей, а также сложностями использования близких по спектру возбуждения белков. Один из векторов развития технологий стимуляции клеток является создание систем быстрой стимуляции с помощью наиболее эффективно проникающих в ткани видов излучения и магнитных полей, которые могут быть разработаны на базе технологий термогенетики.

Термогенетика представляет собой набор методов, направленных на стимуляцию или ингибирование клеток с помощью колебаний температуры образца. Вторая часть данной работы посвящена развитию и оптимизации технологии термогенетики на базе термочувствительных рецепторов змей TRPA1 и активации с помощью инфракрасного (ИК) лазерного излучения.

Цель работы.

Цель настоящей работы заключалась в создании на базе существующего сенсора HyPer усовершенствованного 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. Для выполнения сформулированной цели были поставлены и реализованы следующие задачи:

1. Методом направленного мутагенеза создать и провести отбор клонов красного генетически кодируемого сенсора для детекции пероксида водорода HyPerRed.
2. Охарактеризовать сенсор для детекции пероксида водорода HyPerRed в условиях *in vitro* и *in vivo*.
3. Оценить возможность использования биосенсора HyPerRed в условиях физиологической стимуляции продукции пероксида водорода.
4. Оптимизировать и охарактеризовать флуоресцентные химеры термочувствительных каналов змей TRPA1 для экспрессии в культуре клеток млекопитающих.
5. Провести *in vivo* стимуляцию поведения избегания у личинок *Danio rerio* с помощью активации термочувствительных каналов змей TRPA1.

Научная новизна и практическая ценность работы.

В первой части данной работы описано создание на основе сенсора HyPer генетически-кодируемого сенсора HyPerRed, обладающего спектром красного флуоресцентного белка mApple. Мы охарактеризовали данный сенсор *in situ* и *in vitro*, установив, что HyPerRed не уступает по чувствительности и кинетическим характеристикам исходному сенсору HyPer, а значит может быть использован для детекции физиологических концентраций пероксида водорода в живых клетках, например при стимуляции клеток ростовым фактором EGF.

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 мы обнаружили 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. 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 использованию термоактивируемых каналов змей TRPA1 (caTRPA1, eo1TRPA1) для стимуляции нейронов. TRPA1 змей были выбраны как инструменты термомогенетики, т.к. эти каналы обладают высокой чувствительностью к температуре т.к. в природе змеи используют их для ориентации в процессе охоты в ночное время, что позволяло предположить высокую скорость активации этих белков в образцах.

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

Была описана кинетика активации TRPA1 с помощью сфокусированного ИК излучения, 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 мыши было установлено, что TRPA1 змей

активируются в течение первой миллисекунды с момента начала стимуляции, а также способны воспроизводить частоту стимулирующего импульса, что открывает новые возможности для использования TRPA1 для регулируемого управления деполяризацией и динамикой ионов кальция в клетках. В качестве примера *in vivo* стимуляции с помощью TRPA1 была проведена стимуляция поведения избегания у 2х-дневных личинок *Danio rerio* с помощью активации термочувствительного канала *caTRPA1* и инфракрасного излучения. 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. Полученные данные представляют собой детальное описание процесса активации TRPA1 в различных биологических моделях, а разработанные методы их активации позволяют расширить применение термогенетики в современной науке.

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, оптимизация и применение *in vivo* метода термогенетики для стимуляции клеток с помощью термоактивируемых каналов TRPA1 змей.

Структура диссертации. Диссертационная работа изложена на 135 страницах и состоит из введения, обзора литературы, экспериментальной части, результатов и их обсуждения, выводов, заключения, списка сокращений и списка литературы, включающего 229 ссылок, а также одного приложения,. Диссертация содержит 41 рисунок.

Апробация работы. Основные результаты диссертации были доложены на следующих научных конференциях и школах: «Mechanisms in Biology» 38th FEBS Congress, 2013, Санкт-Петербург, Россия; «From molecules to cells» 39th FEBS–EMBO Congress, 2014, Париж, Франция; «Healthy aging» SFRR-E Spetses Summer School 2014, Спецес, Греция; EMBL Bioimaging Master Course reports, 2015, Гейдельберг, Германия; «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», XXIX Зимняя молодежная научная школа ИБХ РАН, 2017, Москва, Россия.

Публикации. По материалам работы опубликовано 7 статей в рецензируемых журналах, 1 патент РФ.

Содержание работы

1. Красный генетически-кодированный сенсор для детекции пероксида водорода

Генетически кодируемый сенсор для детекции H_2O_2 HyPer открыл новые возможности в изучении сигнальной роли пероксида водорода в живых системах. HyPer обладает рядом преимуществ перед другими красителями для регистрации пероксида водорода, т.к. он высоко специфичен к пероксиду водорода, кодируется генетически, что делает возможной его направленную экспрессию, и нетоксичен для клеток. Сигнал HyPer является обратимым, а высокая чувствительность позволяет использовать его для регистрации H_2O_2 в физиологических условиях. Но существующий сенсор обладает рядом недостатков, такими как низкая интенсивность флуоресценции и спектральные свойства, затрудняющие детекцию в толстых слоях тканей.

Поглощение и автофлуоресценция таких биомолекул, как меланины, кератин, гемоглобин в области 450-500 нм затрудняет возбуждение и детекцию флуоресценции биосенсоров на основе желтых и зеленых флуоресцентных белков, YFP и GFP, но круговые пермутанты этих белков были получены первыми, поэтому исторически сложилось, что большинство флуоресцентных биосенсоров основаны на этих белках. Красные флуоресцентные белки поглощают свет в области 550-580 нм и флуоресцируют в области длин волн 600-650 нм, которые слабее поглощаются живой тканью, поэтому красные белки возбуждаются светом относительно низкой интенсивности, который хорошо проникает в глубокие слои ткани, и позволяют детектировать флуоресценцию низкой интенсивности.

Мы поставили перед собой задачу создать аналог HyPer на основе красного флуоресцентного белка с целью получить сенсор, применимый для совместной микроскопии с другими сенсорами на основе GFP и YFP.

1.1. Создание HyPerRed

Для создания красного флуоресцентного сенсора для детекции пероксида водорода мы заменили последовательность srYFP в последовательности гена сенсора HyPer (Рис.1А) на круговые пермутанты различных красных флуоресцентных белков: mKate2, FusionRed and crmApple, кругового пермутанта белка mApple из генетически-кодированного красного сенсора для детекции кальция R-GECO1.1.

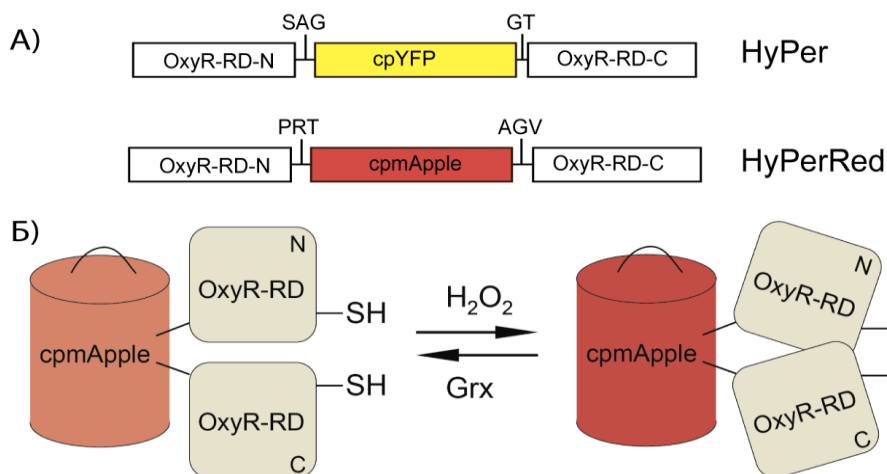


Рисунок 1. Структура HyPerRed. А) Схема строения генов HyPer и HyPerRed. Они отличаются флуоресцентным ядром и линкерными участками. Б) Схема работы HyPerRed. Формирование дисульфидной связи между остатками цистеинов C199 и C208 приводит к конформационным изменениям в структуре сенсора и увеличению флуоресценции сенсора. Grx – глуторедоксин.

Мы протестировали для каждого флуоресцентного ядра несколько библиотек, варьируя длину полипептидных линкеров между cpFP и OxyR, от 2 (в R-GECO1.1 до 3 (1ый линкер HyPer) в различных сочетаниях. В библиотеках с двумя линкерами длиной по 3 а.о. было обнаружено множество клонов, эффективно созревающих при 37 °С, однако только библиотека на основе cpmApple обнаружила в своем составе клоны, чувствительные к низким концентрациям H₂O₂. Вариант сенсора, обладающий максимальным ростом флуоресценции в ответ на добавление пероксида водорода имел линкеры состава Pro-Arg-Thr и Ala-Gly-Val и демонстрировал 80%-повышение флуоресценции после добавления H₂O₂ к бактериальной суспензии; этот вариант сенсора получил название HyPerRed и был проанализирован на выделенном белке.

1.2. Характеристики HyPerRed

Для того, чтобы охарактеризовать спектральные свойства и чувствительность HyPerRed мы очистили этот белок с помощью металл-аффинной хроматографии. Спектр возбуждения и эмиссии очищенного белка HyPerRed повторяет спектр белка mApple. Максимум возбуждения флуоресценции находится на длине волны 575 нм, а максимум эмиссии флуоресценции – на 605 нм (Рис. 2А). Минимальное достоверное изменение спектра флуоресценции исследуемого белка наблюдается при добавлении к пробе H₂O₂ в концентрации 20 нМ, а полное окисление наблюдается после добавления более 300 нМ H₂O₂ (Рис. 2Б,В). Таким образом, HyPerRed обладает сравнимой чувствительностью к пероксиду водорода относительно других представителей линии

HyPer. Добавление 1 мМ 2-меркаптоэтанола к окисленному HyPerRed приводит к практически полному (до 97%) восстановлению сенсора и полному обращению его сигнала (Рис. 2Г).

Остаток Cys199 (нумерация согласно wtOxyR) является критическим для реакции сенсора с H_2O_2 и формирует дисульфидную связь с остатком Cys208 как у wtOxyR, так и HyPer. Для подтверждения роли этого остатка для работы HyPerRed и его реакции с H_2O_2 , мы заменили Cys199 на Ser199. Полученная мутантная конструкция обладала спектральными свойствами, аналогичными HyPerRed, но в то же время HyPerRed-S199S был не чувствителен к добавлению H_2O_2 , что подтверждает гипотезу о том, что в HyPerRed, также как в OxyR и HyPer, Cys199 играет центральную роль в реакции сенсора с H_2O_2 .

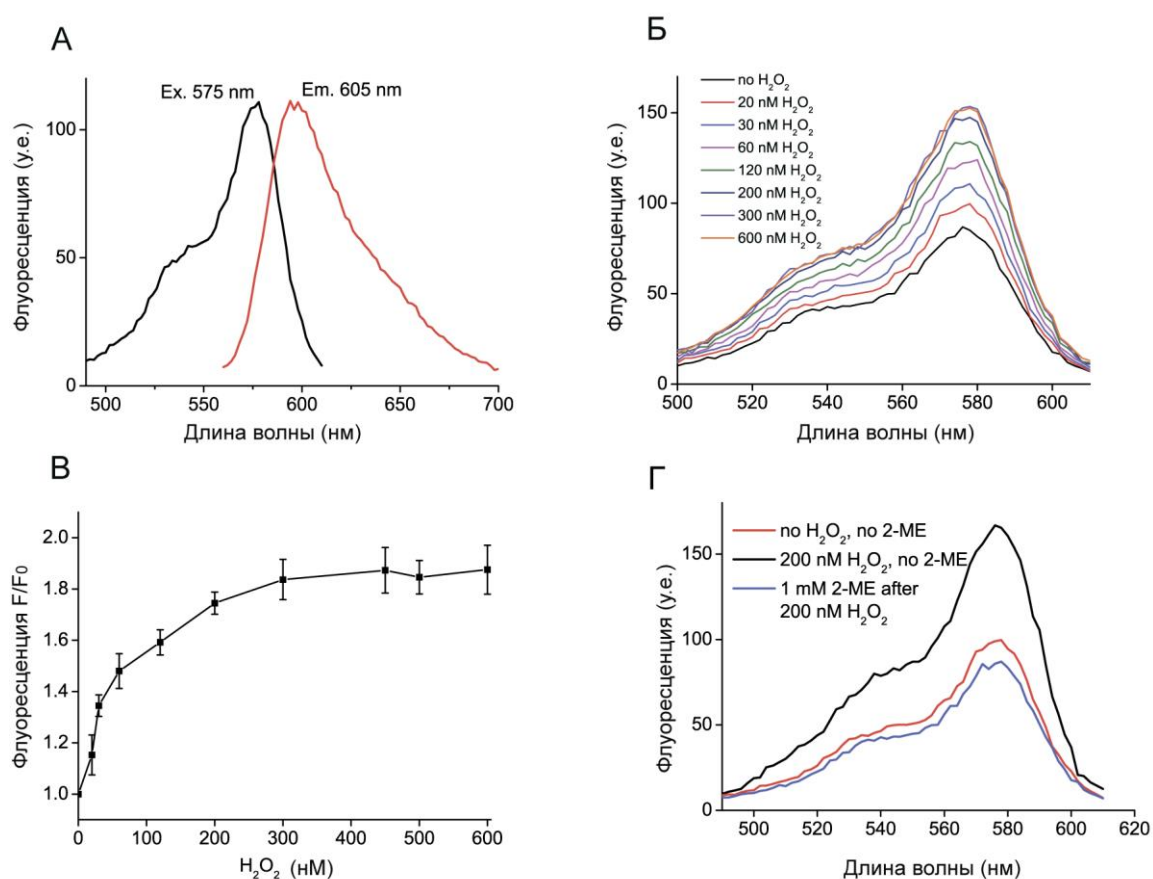


Рисунок 2. Спектральные свойства и чувствительность к H_2O_2 белка HyPerRed.

А) Спектры возбуждения и эмиссии флуоресценции очищенного белка HyPerRed. **Б)** Спектр возбуждения 15 нМ HyPerRed в Tris-HCl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 0.5 мМ 2-меркаптоэтанол, после добавления указанных концентраций H_2O_2 . **В)** Чувствительность выделенного белка HyPerRed к H_2O_2 . **Г)** Добавление 1 мМ 2-меркаптоэтанола к окисленному препарату HyPerRed ведет к восстановлению сенсора. Эмиссия измерена при 620 нм.

Флуоресценция большинства FP сильно зависит от pH. Кривая pH-зависимости очищенного белка HyPerRed отличается от таковой для HyPer и повторяет кривую pH-зависимости R-GECO1.1 в связанном с кальцием состоянии, pKa HyPerRed составляет 8.5, и 8.7 для HyPerRed-C199S, что соответствует полностью восстановленному HyPerRed.

Для оценки яркости флуоресценции сенсора HyPerRed мы измерили коэффициент экстинкции и квантовый выход флуоресценции этого белка. Квантовый выход очищенного HyPerRed в окисленной форме составляет 0.29. Коэффициент экстинкции при 577 нм составляет $39000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ делая HyPerRed в окисленной форме почти в 5-раз ярче HyPer в окисленной форме.

Диапазон детектируемых HyPerRed концентраций H_2O_2 при экспрессии в цитоплазме клеток *E.coli*. составляет 10 - 300 μM , что хорошо соотносится с данными для HyPer и wtOxyR *in vivo*. Окисление HyPerRed в бактериальных клетках обратимо: после полного окисления сенсор восстанавливается, и флуоресцентный сигнал падает до базового значения в течение 8-10 мин, затем HyPerRed снова может быть использован в новом цикле окисления-восстановления в бактериальных клетках.

HyPer и OxyR специфичны к H_2O_2 и не взаимодействуют с другими окислителями. Однако, замена флуоресцентной части сенсора может привести к структурным изменениям в OxyR-RD, снижая специфичность сенсора. Для подтверждения специфичности реакции HyPerRed с H_2O_2 мы проинкубировали очищенный белок HyPerRed с различными окислителями *in vitro*. Оксид азота (NO, источник 1мМ МАНМА-NONOate), 1 мМ окисленный глутатион (GSSG), смесь ксантин-ксантиноксидаза/каталаза и смесь SIN-1/каталаза не привели к изменениям в спектре HyPerRed. Таким образом, HyPerRed обладает специфичностью, сравнимой с таковой для OxyR и HyPer, относительно H_2O_2 , что позволяет специфически регистрировать H_2O_2 с помощью HyPerRed.

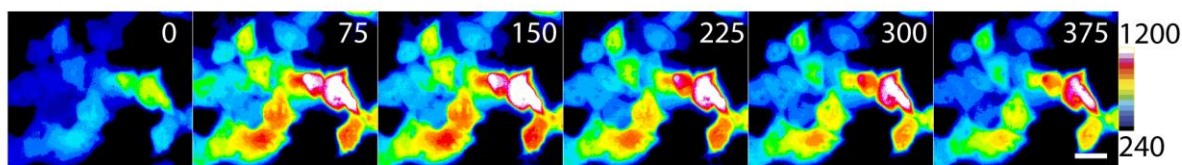
1.3. Применение HyPerRed в культуре эукариотических клеток

Мы исследовали реакцию HyPerRed на экзогенное добавление пероксида водорода при экспрессии в цитоплазме клеток линии HeLa Kyoto с помощью флуоресцентной микроскопии. Для определения чувствительности сенсора к пероксиду водорода мы добавляли возрастающие концентрации H_2O_2 к среде, в которой проводили микроскопию клеток. Добавление 6 μM пероксида водорода вызывало минимальные детектируемые изменения флуоресценции HyPerRed, что сравнимо с результатами, полученными для HyPerRed при экспрессии в цитоплазме бактериальных

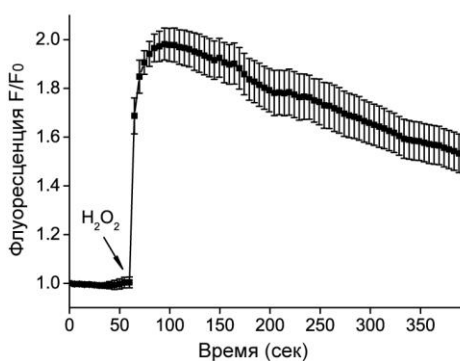
клеток *E.coli*, а также с результатами, полученными ранее для зеленых версий сенсора HyPer. Добавление 200 μM H_2O_2 приводит к максимальному изменению сигнала HyPerRed (Рис. 3). Таким образом, HyPerRed можно использовать для детекции H_2O_2 в эукариотических клетках.

Далее мы проанализировали кинетические параметры HyPerRed при экспрессии в цитоплазме эукариотических клеток. Мы проводили эти измерения на клеточной культуре HeLa Kyoto с использованием так называемых микроскопических μ -слайдов, которые позволяют моментально заменить клеточную среду без H_2O_2 на среду с известной концентрацией пероксида водорода. Кинетические параметры окисления аналогичны для HyPer, HyPerRed, и wtOxyR. Концентрация пероксида водорода, необходимая для 50%-окисления сенсора (константа полуреакции K_{ox}) между сенсором и пероксидом водорода HyPerRed составляет 140 нМ. Константа скорости реакции псевдопервого порядка (K_s) составляет $3 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ для HyPerRed и $5 \cdot 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{сек}^{-1}$ для HyPer. Время полувосстановления HyPerRed выше, чем для HyPer и ближе к HyPer2. Сигнал HyPerRed C199S не изменяется при добавлении к эукариотическим клеткам H_2O_2 .

А



Б



В

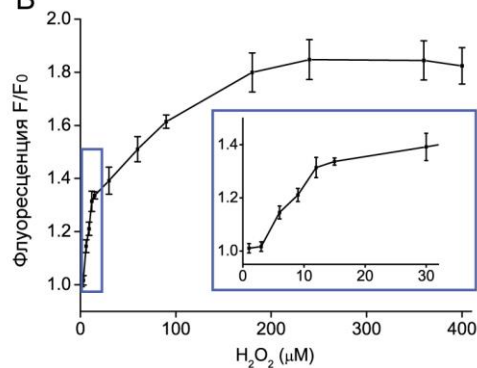


Рисунок 3. Ответ HyPerRed на добавление H_2O_2 в эукариотических клетках.

А) Изображения клеток HeLa Kyoto, экспрессирующих HyPerRed в ответ на добавление 150 μM H_2O_2 . Цифрами указано время в секундах. Масштаб, 40 мкм. Таблица иллюстрирует изменение интенсивности флуоресценции HyPerRed. **Б)** Динамика изменения флуоресценции в индивидуальных, экспрессирующих HyPerRed и показанных на панели А. **В)** Возрастание флуоресценции HyPerRed в клетках HeLa Kyoto в зависимости от экзогенной концентрации H_2O_2 .

1.4. HyPerRed детектирует низкие концентрации H_2O_2 , продуцируемые клетками при стимуляции ростовым фактором

Мы исследовали возможность применения HyPerRed для изучения внутриклеточной передачи сигнала в живых клетках. Определенные ранее кинетические параметры и чувствительность HyPerRed позволяют предположить, что этот сенсор также может быть использован для детекции низких концентраций H_2O_2 , образующихся в эукариотических клетках под действием ростовых факторов. Более того, спектральные свойства HyPerRed делают его применимым в мультипараметрической микроскопии.

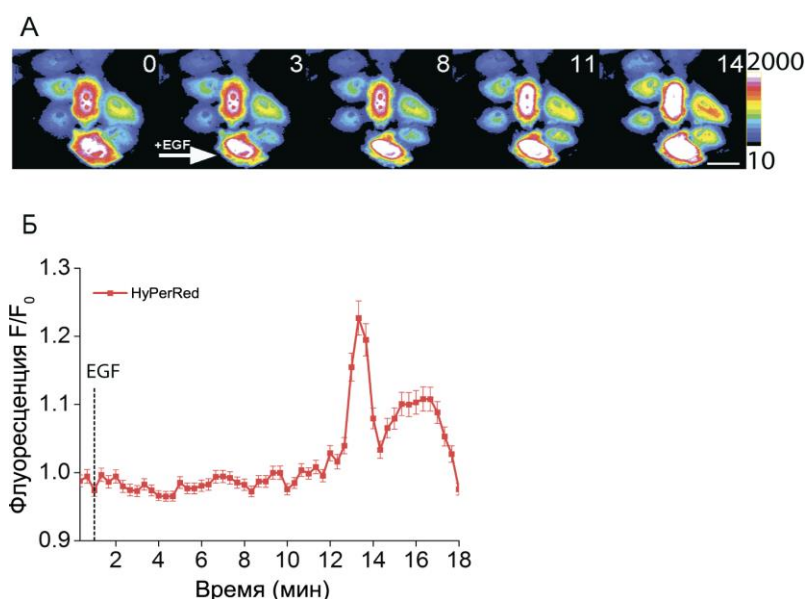


Рисунок 4. Стимуляция клеток HeLa Kyoto ростовым фактором EGF. А) HyPerRed в транзигентно трансфицированных клетках HeLa под действием 100 нг/мл EGF. Цифрами указано время в минутах. Масштаб, 40 мкм. Б) Динамика флуоресценции HyPerRed в клетках панели А.

Добавление 100 нг/мл EGF к клеткам HeLa Kyoto, трансфицированным белком слияния EGFR-YFP, кальциевым сенсором B-GECO и сенсором HyPerRed, ведет к эндогенной продукции H_2O_2 и повышению флуоресценции HyPerRed (Рис. 4), что согласуется с данными, полученными для зеленых форм сенсоров HyPer. В то же время, HyPerRed-C199S не демонстрирует никакого ответа на добавление EGF к среде клеток HeLa Kyoto, подтверждая, что изменения внутриклеточного pH не являются причиной изменения сигнала сенсора HyPerRed в этой модели. Таким образом, чувствительность HyPerRed и его динамические параметры позволяют использовать этот сенсор для детекции низких внутриклеточных концентраций H_2O_2 . Спектральные свойства сенсора HyPerRed позволяют комбинировать его с зелеными, желтыми и

синими флуоресцентными белками, что в дальнейшем позволяют использовать его для многопараметрической микроскопии сигнальных каскадов клеточных рецепторов.

1.5. Изучение динамики H_2O_2 в различных клеточных компартментах на уровне одной клетки

Митохондриальная продукция АФК часто связана кальциевым внутриклеточным сигналингом. Считается, что выброс Ca^{2+} стимулирует продукцию АФК в митохондриях. В то же время существует множество работ, демонстрирующих повышение, или понижение, или вовсе отсутствие эффекта выброса Ca^{2+} на продукцию АФК в митохондриях.

Мы направленно экспрессировали HyPerRed в митохондриальном матриксе с помощью добавления двойного сигнала митохондриальной локализации (dmito-, double mitochondrial) к N-концу HyPerRed. Мы коэкспрессировали dmito-HyPerRed с различными вариантами митохондриальных и цитоплазматических сенсоров в клетках HEK293 для детекции изменений в уровне H_2O_2 , соотношении восстановленного и окисленного глутатиона (GSH/GSSG) и значении pH. При добавлении тапсигаргина, ингибитора SERCA, Ca^{2+} -насоса, ответственного за откачку Ca^{2+} из цитоплазмы в ЭПР, мы наблюдали низко интенсивный, но хорошо различимый всплеск продукции H_2O_2 в митохондриальном матриксе (Рис. 5). Так как HyPerRed характеризуется pH-чувствительностью, аналогичной таковой для зеленых версий HyPer, мы проверили, может ли быть обусловлен ответ HyPerRed на тапсигаргин (TG) продукцией H_2O_2 , или он обусловлен TG-зависимым защелачиванием матрикса митохондрий. Для этого мы коэкспрессировали dmito-HyPerRed с мито-HyPerC199S (dmito-SypHer). В то время как dmito-HyPerRed отвечал на добавление TG кратковременным повышением флуоресценции, сигнал dmito-SypHer (R/R_0) не изменился в ответ на добавление TG (Рис. 5B, Г), что говорит о стабильности pH в митохондриальном матриксе в данной системе. Таким образом, именно продукция пероксида водорода является причиной повышения сигнала dmito-HyPerRed.

Продукция H_2O_2 может приводить к окислению глутатиона. В этом случае логично предположить, что с продукцией H_2O_2 в митохондриальном матриксе будет связано изменение соотношения GSH/GSSG. Для того, чтобы определить взаимосвязь TG-индуцированной продукции H_2O_2 с окислительно-восстановительным состоянием пула глутатиона, мы экспрессировали dmito-HyPerRed с dmito-Grx1-RoGFP2. Оба сенсора активно отвечают на добавление экзогенного пероксида водорода, но TG

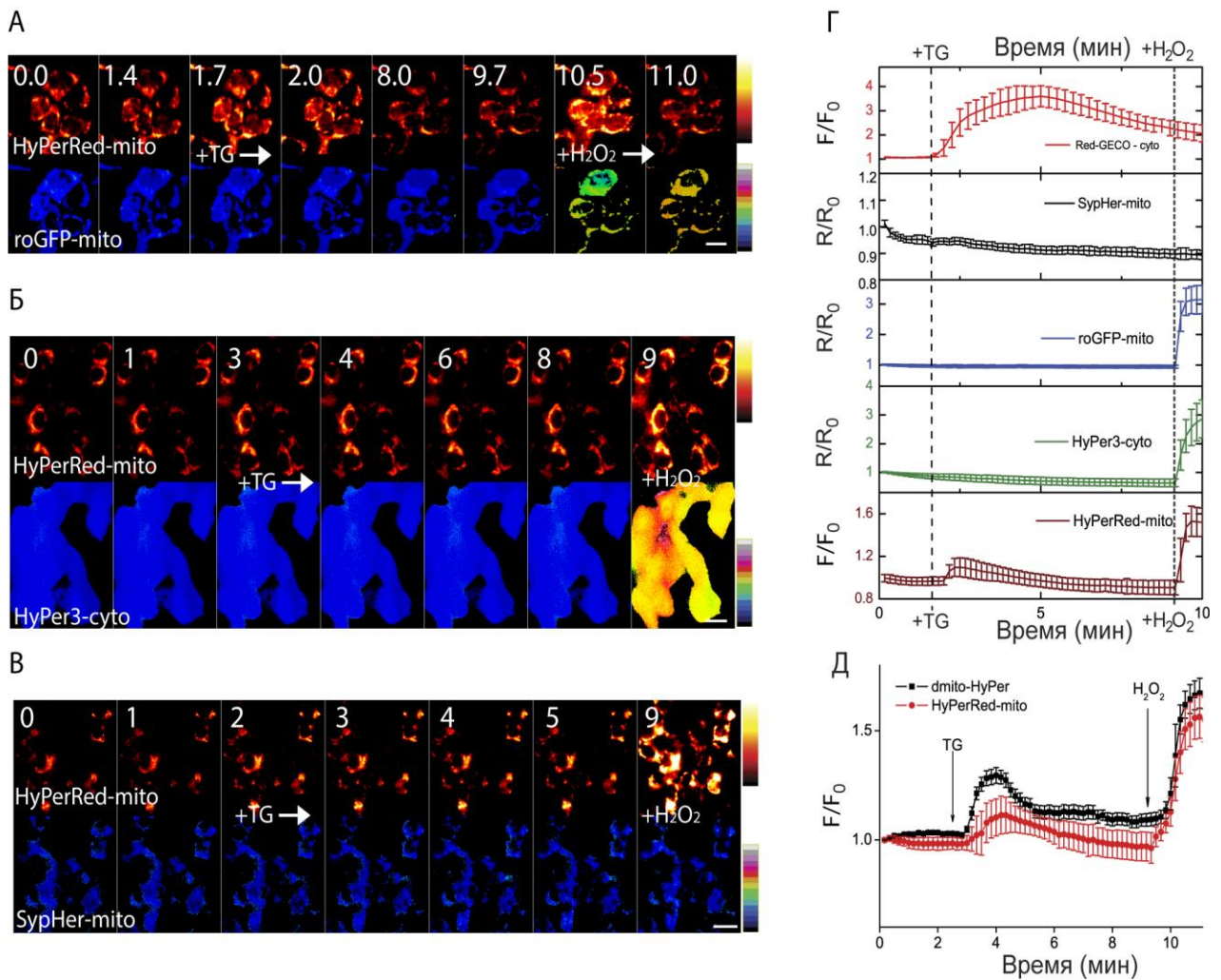


Рисунок 5. Мультипараметрическая микроскопия H_2O_2 , $GSH/GSSG$, Ca^{2+} и pH.

А) Ингибирование АТФазы SERCA тапсигаргином (TG) приводит к продукции пероксида водорода в митохондриальном матриксе, в то время как соотношение $GSH/GSSG$ остается стабильным. Клетки HEK293 были котрансфецированы dmito-HyPerRed и dmito-Grx1-RoGFP2, масштаб 20 μm . Цифры показывают время в минутах. Масштаб цветового сигнала HyPerRed (3700-25000), Grx1-RoGFP2 (0.5-4.0). **Б)** H_2O_2 не диффундирует в цитоплазму клеток. Клетки HEK293 были котрансфецированы dmito-HyPerRed и цитоплазматическим HyPer3, масштаб 30 μm . Цифры показывают время в минутах. Масштаб цветового сигнала HyPerRed (3700-25000), HyPer3 (0.5-6.0). **В)** pH митохондриального матрикса остается стабильным в процессе стимуляции клеток тапсигаргином (TG). Клетки HEK293 были котрансфецированы dmito-HyPerRed и dmito-Grx1-RoGFP2, масштаб 40 μm . Цифры показывают время в минутах. Масштаб цветового сигнала HyPerRed (3700-25000), dmito-SypHer (0.5-4.0). **Г)** TG вызывает продукцию H_2O_2 в митохондриальном матриксе (измерено с помощью HyPerRed-mito), и всплеск Ca^{2+} в цитоплазме (Red-GECO-cyto), в то время как цитоплазматический уровень H_2O_2 (HyPer3-cyto), митохондриальное соотношение $GSH/GSSG$ (roGFP-mito), а также матричный уровень pH (SypHer-mito) остаются постоянными в процессе стимуляции. Более 100 клеток в 2 или более экспериментах, бары обозначают среднее значение \pm ошибка среднего. В каждом эксперименте клетки HEK293 трансфецированы HyPerRed-mito или Red-GECO-cyto и еще одним сенсором (HyPer3-cyto/ roGFP-mito/SypHer-mito). Агонист добавлен на 1.7 мин. **Д)** Обе митохондриальные версии сенсоров dmito-HyPerRed (HyPerRed-mito) и

dmito-HyPer демонстрируют продукцию пероксида водорода при стимуляции клеток HEK293. TG добавлен на 2.5 мин. Более 100 клеток в 2 или более экспериментах.

индуцирует изменения флуоресценции исключительно dmito-HyPerRed, что говорит об отсутствии изменений в соотношении GSH/GSSG в матриксе митохондрий (Рис. 5А, Г). Таким образом, мы показали, что глутатион не используется для восстановления окисленных соединений в митохондриальном матриксе при стимуляции продукции H_2O_2 с помощью TG.

Внутренняя мембрана митохондрий клеток проницаема для экзогенно добавленного H_2O_2 , т.к. H_2O_2 индуцирует окисление dmito-HyPerRed. Это означает, что TG-индуцированная продукция H_2O_2 , регистрируемая в митохондриальном матриксе с помощью dmito-HyPerRed, может распространяться на цитоплазму клетки, или, напротив, может возникнуть в цитоплазме клеток, и распространится в митохондриальный матрикс.

Для ответа на этот вопрос мы коэкспрессировали dmito-HyPerRed с ненаправленно экспрессирующимся HyPer3, локализованным в цитоплазме. HyPer3 не продемонстрировал изменения сигнала в ответ на добавление TG (Рис. 5Б, Г), что говорит о том, что продукция H_2O_2 имеет митохондриальное происхождение и не распространяется в цитоплазму клетки. Так же важно отметить, что соотношение GSH/GSSG в цитоплазме остается стабильным в течение этого процесса.

Отсутствие окисления HyPer3 в цитоплазме под действием TG опровергает предположение о том, что H_2O_2 выполняет в клетках сигнальную функцию исключительно в цитоплазматическом компартменте, по крайней мере, это не так в случае стимуляции клеток с помощью TG. Митохондриальный H_2O_2 также может выполнять роль сигнальной молекулы в матриксе митохондрий. Однако, существует вероятность «утечки» матричного H_2O_2 в трансмембранное (межмембранное) пространство митохондрий (IMS). IMS также может быть местом продукции АФК в этом случае благодаря работе Комплекса III дыхательной цепи митохондрий.

Мы поставили себе задачу определить локализацию продукции H_2O_2 в митохондриях. Для этого мы получили белок слияния HyPer2 с белком SMAC/DIABLO для локализации сенсора в IMS, и котрансфецировали эту конструкцию с dmito-HyPerRed в клетках HEK293.

Мы использовали рН-чувствительность сенсоров линии HyPer как способ определить их локализацию в субмитохондриальных компартментах. Добавление СССР (карбонил цианид м-хлорфенил гидразон), агента, позволяющего снимать протонный градиент между матриксом и межмембранным пространством

митохондрий. Сенсоры, локализованные в матриксе, будут чувствительны к добавлению СССР, т.к. рН в матриксе резко упадет, а сенсоры, локализованные в межмембранном пространстве, нет. *ims-HyPer2* оказался не чувствителен к добавлению СССР, в то время как *dmito-HyPerRed* по прежнему отвечал понижением интенсивности флуоресценции, что свидетельствует о различной локализации данных сенсоров. Оба сенсора сохраняли чувствительность к H_2O_2 , что говорит об их функциональной активности. Добавление TG индуцировало повышение сигнала *dmito-HyPerRed*, но не изменяло сигнал *ims-HyPer2*. Это свидетельствует о локализации источника АФК в митохондриальном матриксе, а также об отсутствии «утечки» АФК через внутреннюю мембрану митохондрий в результате блокировки откачки Ca^{2+} при помощи ингибирования SERCA.

Снижение или полное удаление кальция из среды, в которой находятся клетки в момент стимуляции клеток TG (что в итоге приводит к истощению внутриклеточных запасов кальция), снижает амплитуду продукции АФК в митохондриальном матриксе, но не приводит к полному исчезновению этого эффекта. Ротенон, ингибитор Комплекса I дыхательной цепи митохондрий, сильно ослабляет продукцию H_2O_2 в матриксе, что указывает на дыхательную цепь митохондрий в качестве места локализации источника АФК в случае стимуляции клеток с помощью TG (Рис.5А).

Таким образом, ингибирование откачки Ca^{2+} в ЭПР тапсигаргином индуцирует небольшую, локальную и кратковременную продукцию H_2O_2 , которая не ассоциирована с детектируемым окислением глутатиона (GSH) в матриксе митохондрий или цитоплазме. H_2O_2 не распространяется из матрикса в межмембранное пространство митохондрий (IMS) или цитоплазму.

2. Термогенетика

Оптогенетика представляет собой набор методов, которые позволяют локально активировать индивидуальные клетки с помощью света и светозависимых белков, но методы оптогенетики имеют ряд недостатков, связанных в основном с ограничениями по доставке активирующего света в глубокие слои ткани и низкой проводимостью индивидуальных бактериальных описнов, являющихся главными инструментами оптогенетики. Так при оптоволоконной доставке излучения в диапазоне 350-635 нм на расстоянии 1 мм от торца оптоволоконна теряется около 90% мощности излучения, что приводит к использованию избыточных мощностей стимуляции, которые обладают фототоксическим эффектом и могут приводить к повреждению слоев ткани, примыкающих к торцу оптоволоконна. Термогенетика представляет собой

альтернативный подход, сочетающий в себе описанные преимущества оптогенетики, но имеющий несколько дополнительных плюсов.

Термоактивируемые каналы (TRPs , *Transient Receptor Potential*), являющиеся инструментами термогенетики, не нуждаются в стимуляции видимым светом, который плохо проникает в оптически плотные ткани животных из-за высокого поглощения пигментов крови и кожи, и могут быть активированы с помощью инфракрасного излучения, находящегося в т.н. «оптическом окне» поглощения животных тканей (650-1100 нм), что облегчает равномерную доставку излучения ко всем клеткам образца, СВЧ излучения или высокочастотного магнитного поля. Эти белки представляют собой неселективные катионные каналы, имеющие почти на 3 порядка большую проводимость индивидуального канала относительно ChRs, и чувствительные к малейшим повышениям температуры (от 0.1°C). В качестве температурных активаторов для своей работы мы выбрали термочувствительные каналы змей саTRPA1 (*Crotalus atrox*), eolTRPA1 (*Pantherophis obsoletus lindheimeri*). Среди описанных на сегодняшний день термоканалов саTRPA1 и eolTRPA1 характеризуются одной из наиболее высоких термочувствительностей. Каналы TRPA1 змей также будут эволюционно далекими белками для используемых модельных организмов, что позволит избежать вторичной регуляции с помощью клеточных ферментов. Использование неродственных белков позволит задать с помощью специфических промоторов специфичность экспрессии, а также снизить вероятность коактивации собственных температурных рецепторов, имеющих отличные от змеиных каналов характеристики активации.

В результате междисциплинарной работы с сотрудниками лаборатории А.М. Жёлтикова (МГУ им. М.В. Ломоносова), и группы Е.С. Никитина (ИВНД РАН), нам удалось описать частотные и кинетические характеристики работы термоактивируемых каналов змей, применить их для локальной активации нейронов млекопитающих в культуре, а также *in vivo* в личинке рыбы *Danio rerio*.

2.1 Выбор флуоресцентной метки для термоактивируемых каналов TRPA1

Для использования термочувствительных каналов в экспериментальной работе необходимо подобрать оптимальные условия их визуализации в образцах. Мы протестировали несколько вариантов нерасщепляемых конструкций TRPA1, позволяющих определять локализацию канала в клетке: N – и C-концевые белки слияния TRPA1 с флуоресцентными белками mCherry, mNeonGreen, а также

конструкции с внесением полигистидинового эпитопа HisTag в петлю между трансмембранными доменами канала S1 и S2. (Рис. 6А) Все полученные конструкции локализовались преимущественно на плазматической мембране клеток, а полученные белки слияния характеризуются сравнительно низкой интенсивностью флуоресценции относительно свободных флуоресцентных белков того же типа.

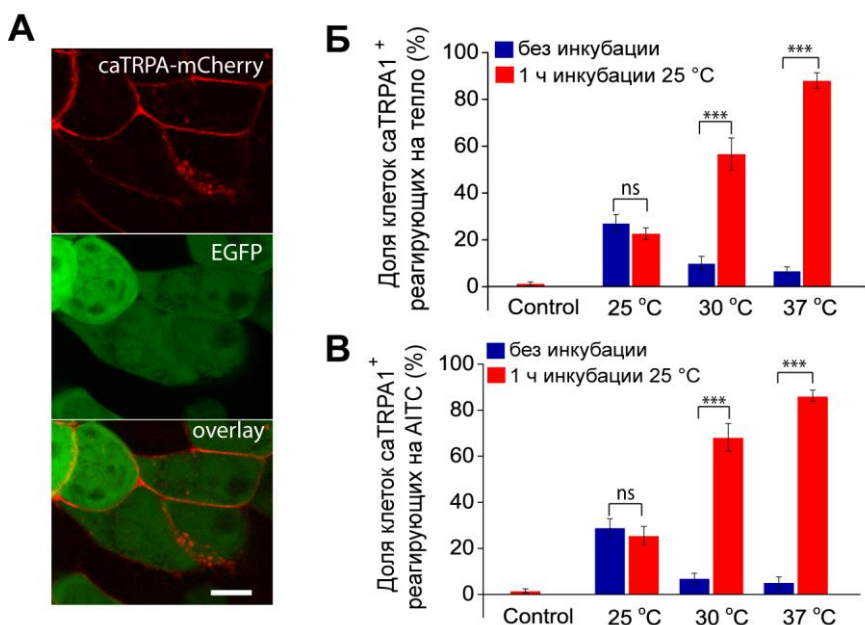


Рисунок 6. Локализация меченных производных TRPA1 в клетках HEK293. А) Белок слияния caTRPA1-GSL-mCherry в котрансфекции с EGFP. Б) Доля активирующихся HEK293, экспрессирующих caTRPA1 в ответ на добавление подогретой клеточной среды. В) Доля активирующихся HEK293, экспрессирующих caTRPA1 в ответ на добавление 200 μ M AITC. Более 100 клеток в 3 экспериментах. *** $p < 0.001$, парный t -тест, ns-not significant (незначимо).

Конструкции, в которых через полипептидный линкер к С-концу присодинен флуоресцентный белок, на 80% снизили амплитуду активации, и эффективность активации (число активированных клеток относительно числа трансфицированных) упала на 70-80%.

Чтобы избежать дальнейших сложностей с экспрессией и функциональной активностью TRPA1, мы получили конструкции на основе автопротеолитического сайта P2A (TRPA1-P2A-tdTomato) и конструкции на основе IRES2 (TRPA1-IRES2-EGFP), которые позволяют визуализировать трансфекцию клеток каналом, а также не отличаются по амплитуде и эффективности стимуляции от немеченных вариантов TRPA1. Эти конструкции в котрансфекции с генетически-кодируемыми сенсорами для детекции катионов кальция GCaMP6s или R-GECO1.1 были использованы в дальнейших экспериментах.

2.2. Выбор температурных условий экспрессии TRPA1

Термочувствительные TRPA1 активируются и индуцируют мощный вход в клетки катионов кальция тогда, когда температура превышает т.н. пороговую температуру активации. Также ранее считалось, что инактивация канала и снижение концентрации Ca^{2+} , происходящее преимущественно за счет работы клеточных АТФаз ЭПР и плазматической мембраны, наступает после снижения температуры. В процессе работы с TRPA1 нами было отмечено, что длительная инкубация клеток, экспрессирующих TRPA1 на температуре, превышающей порог их активации, указанный в литературе ($T_{\text{ON}} \approx 27.6 \pm 0.9^\circ\text{C}$ для саTRPA1) и $T_{\text{ON}} \approx 37.2 \pm 0.7^\circ\text{C}$ для еоlTRPA1), не приводит гибели клеток, чего можно было бы ожидать.

Но эти клетки не отвечают на химическую или температурную стимуляцию TRPA1 сразу после переноса их на столик микроскопа на подпороговую температуру (Рис. 6Б, В). Но если протемперировать их при подпороговой температуре (25°C для саTRPA1 и 35°C для еоlTRPA1) в течение как минимум часа, то они демонстрируют эффективную активацию, как при повышении температуры, так и при добавлении $200\ \mu\text{M}$ АИТС. Всё это свидетельствует о наличии у TRPA1 собственных механизмов блокировки конститутивной активации в течение длительного времени, или же о том, что для создания готовой к активации конформации TRPA1 необходима инкубация на подпороговой температуре. Это свойство TRPA1 делает их удобными для экспрессии в эукариотических культурах, выращиваемых в большинстве своем при $37\text{-}39^\circ\text{C}$, даже если пороговое значение температуры активации исследуемых TRPA1 ниже нормальной температуры культивации образцов.

2.3. Определение порога активации TRPA1

Экспрессия неродственных белков в модельных организмах может приводить не только к появлению новых свойств у исследуемых моделей, но и к изменению характеристик работы этих белков в новой среде. Мы провели поиск порога активации термоканалов, повышая температуру клеток ступенчато на 0.5°C , и наблюдая за сигналом R-GECO1.1. T_{ON} , определяемая как температура, при которой наблюдается видимый флуоресцентный ответ R-GECO1.1 на нагрев составила $27.8 \pm 0.6^\circ\text{C}$ и $38.5 \pm 0.7^\circ\text{C}$ для саTRPA1 и еоlTRPA1, соответственно. По расчетам с использованием кинетики активации (уравнение Аррениуса) пороговая температура T_a составляет $27.4 \pm 0.4^\circ\text{C}$ и $37.9 \pm 0.8^\circ\text{C}$ для каналов саTRPA1 и еоlTRPA1, соответственно, что хорошо согласуется с полученными ступенчатым методом результатами. Также следует отметить, что при стимуляции клеток импульсами одинаковых параметров,

кинетика их динамики Ca^{2+} полностью воспроизводится. При стимуляции клеток различными по мощности, но одинаковыми по длительности ИК импульсами с ростом мощности растет и скорость нарастания сигнала кальциевого сенсора, что определяет активацию терморепторов как хорошо контролируемый по скорости процесс.

2.4. Изучение динамики Ca^{2+} в нейронах мыши при активации TRPA1 ИК излучением и химическим агонистом

На сегодняшний день основным полем применения термогенетики является активация возбудимых клеток, таких как нейроны и мышечные клетки. Но изучение активации неродственных терморепторов в нейронах млекопитающих требует особого внимания, более того, многие работы по применению опто- и термогенетики описывают косвенные, обычно поведенческие эффекты *in vivo* активации ChRs и терморепторов, без измерения характеристик работы отдельных нейронов. Конструкции TRPA1_{HisTag} для caTRPA1 и eoTRPA1 преимущественно локализируются на плазматической мембране нейронов, что подтверждает характер локализации TRPA1 в клетках HEK293 (Рис.6,7).

Диаметр лазерного пучка в данных экспериментах составлял 50-60 μm , что сравнимо с диаметром индивидуальных нейронов мыши (30-50 μm), таким образом, ИК стимуляция позволяет работать с нейронами на уровне индивидуальных клеток и групп клеток. Активация 10 мс ИК импульсом приводит к 50% нарастанию сигнала GCaMP6s за 30-40 мсек с момента начала стимуляции (Рис.5Б), что свидетельствует об крайне быстрой для подсемейств TRPA-TRPV активации TRPA1 змей.

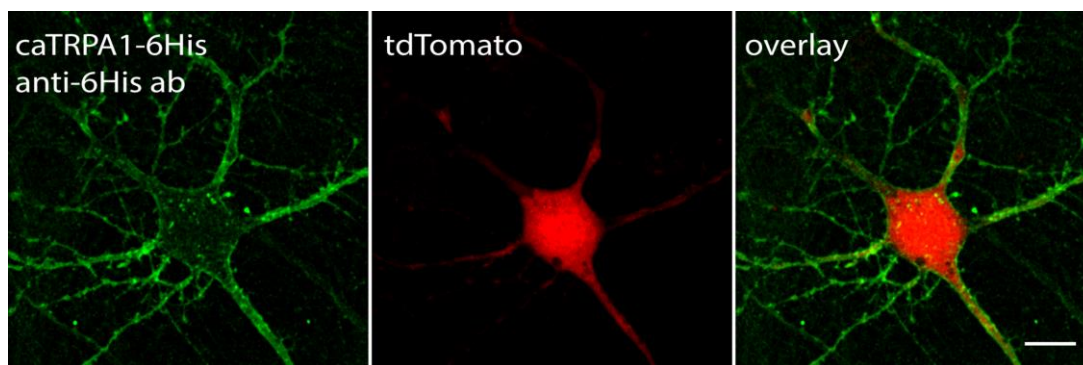


Рисунок 7. Локализация меченных производных TRPA1 в нейронах кортикальной культуры мыши. Иммунофлуоресцентное окрашивание фиксированных нейронов, экспрессирующих содержащую эпитоп HisTag версию канала caTRPA1_{HisTag}-P2A-tdTomato, окрашенную по методу ICH системой 2х антител Mouse-Antimouse Alexa 488.

Частота стимуляции воспроизводится в частоте кальциевых колебаний в цитоплазме нейронов, что позволяет использовать TRPA1 для контроля кальциевого сигналинга клеток (Рис. 8А). Также стоит отметить, что повторные импульсы вызывали

более интенсивный кальциевый ответ нейрона, чем первый импульс (Рис.8А). Данный эффект может быть вызван накоплением температуры, т.е. первый импульс может приводить к подпороговой стимуляции, затем образец не успевает полностью рассеять тепло от первого ИК-импульса, и последующие импульсы суммарно дают более высокую конечную температуру, чем первый, и, следовательно, более контрастный ответ канала. Другой причиной может быть следовая деполяризация нейрона после первой активации канала, которая облегчает активацию нейрона последующими импульсами.

Затухание кальциевого ответа происходит в среднем в течение 3-3,5 сек после окончания последнего импульса (Рис. 8Б). Такое длительное затухание ответа связано не столько с работой канала, сколько с высокой аффинностью кальциевого сенсора GCaMP6s к ионам Ca^{2+} , что приводит к низкой скорости освобождения индикатора от связанных ионов Ca^{2+} , а также с медленной работой откачивающих ионы Ca^{2+} АТФаз.

Как в случае стимуляции с помощью ИК излучения, так и в случае стимуляции агонистом АИТС (200 μ M), активация TRPA1 в нейронах приводило к мощной вспышке концентрации Ca^{2+} в цитоплазме нейронов. В случае обоих видов стимуляции амплитуда кальциевого сигнала GCaMP6s, стимулируемого eolTRPA1, была меньше, чем амплитуда сигнала, стимулируемого saTRPA1.

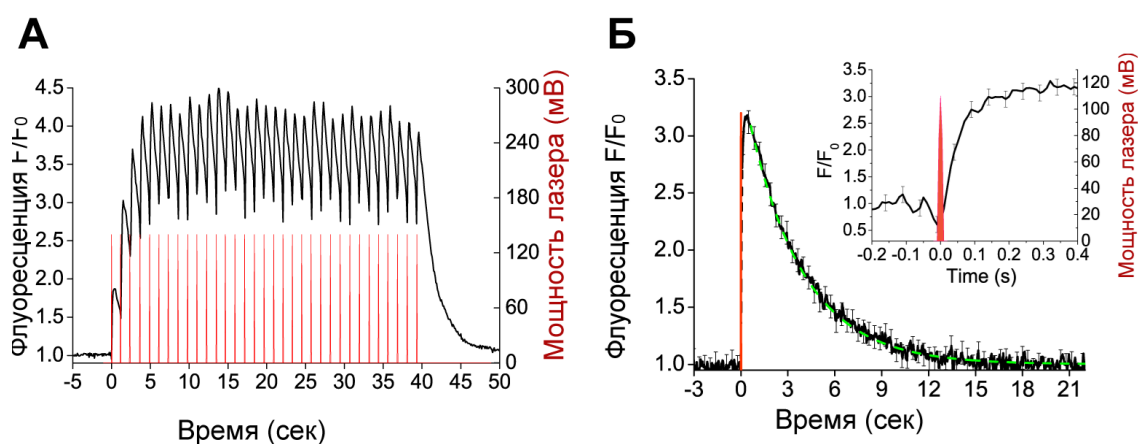


Рисунок 8. Стимуляция нейронов мыши, экспрессирующих TRPA1-P2A-tdTomato и GCaMP6s. А) Импульсная стимуляция колебаний кальция в цитоплазме нейрона. Динамика сигнала сенсора GCaMP6s (черный) по частоте соответствует частоте импульсов ИК-излучения (красный). Длительность импульса 10 мс, задержка 1,23 с, частота импульсов 0,81 Гц, разрешение сигнала 100 мс. Б) Активация нейрона ИК импульсом длительностью 15 мс, время активации нейрона 30-40 мс.

Амплитуда ИК стимуляции в случае обоих каналов уступает по амплитуде и длительности химической стимуляции АИТС, что говорит о её краткосрочности по

сравнению с химической активацией TRPA1. Контрольные клетки, трансфицированные GCaMP6s и tdTomato, не реагировали ни на ИК-стимуляцию на любых использованных комбинациях параметров, ни на химическую стимуляцию 200 μ M АИТС.

2.4. Электрофизиологические характеристики работы TRPA1 в нейронах мыши

Импульсы длительность 10 мсек (1342 нм) с энергией E индуцировали одиночные потенциалы действия (ПД) в нейронах, экспрессирующих как саTRPA1 ($E = 1.0$ мДж), так и еоTRPA1 ($E = 1.7$ мДж) с базовой температуры (27 °С для саTRPA1 и для еоTRPA1 35.5 °С). При увеличении длины импульса до 50-100 мсек один стимул вызвал генерацию 2-5 ПД. При использовании описанных параметров стимуляции в контрольных нейронах, экспрессирующих только tdTomato, генерации ПД в ответ на стимуляцию мы не наблюдали.

Лазерные импульсы меньшей энергии вызывали подпороговые изменения разности потенциалов, как саTRPA1 ($E = 9$ мДж, 9.8 ± 1.3 мВ, Рис.7А), так и еоTRPA1 ($E = 27$ мДж, 12 ± 3.4 мВ, Рис. 9Б).

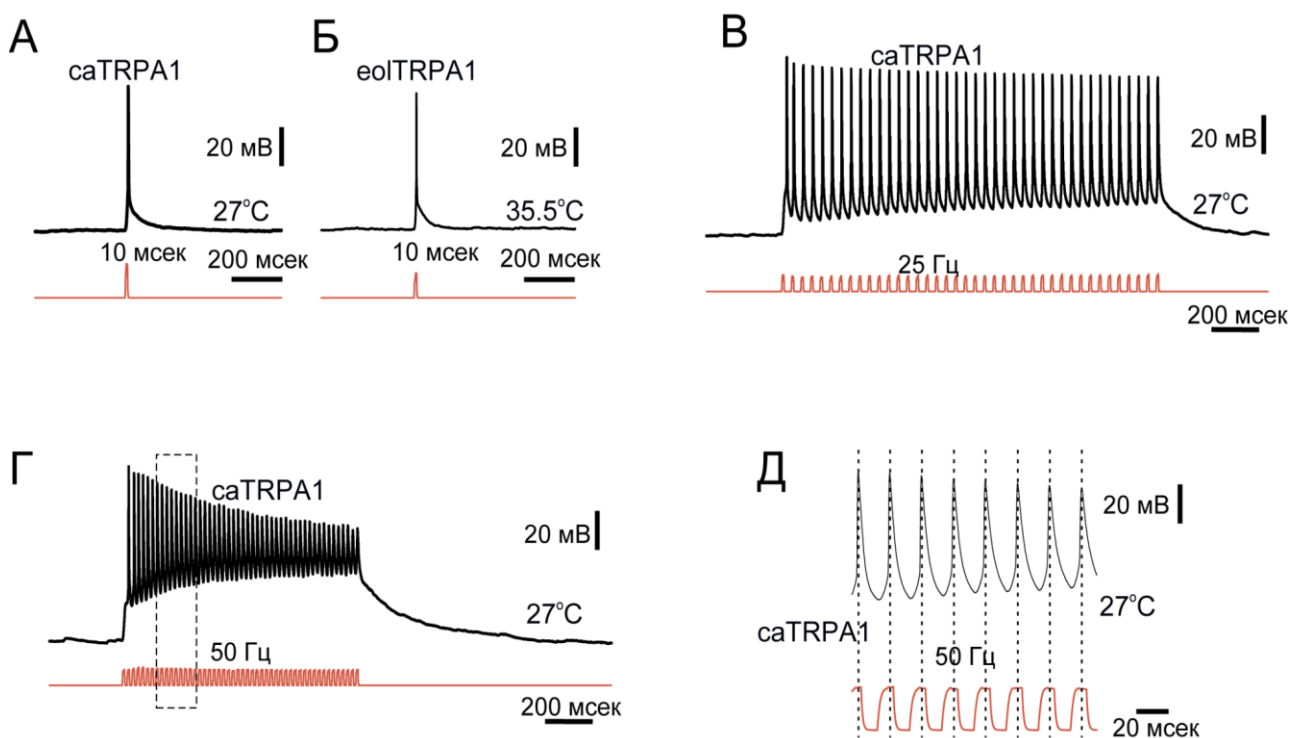


Рисунок 7. Темперогенетическая активация нейронов мыши в культуре, экспрессирующих TRPA1-P2A-tdTomato. А) Индивидуальный ПД, вызванный 10-мс лазерным импульсом с длиной волны 1342 нм ($E = 1,0$ мДж) в саTRPA1⁺ нейроне на базовой температуре 27 °С. Б) Индивидуальный ПД, вызванный 10-мс лазерным импульсом с длиной волны 1342 нм ($E = 1,7$ мДж) в еоTRPA1⁺ нейроне на базовой температуре 35.5 °С. В) Пример фазовой автоподстройки отклика саTRPA1⁺ нейронов на частоте стимуляции 25 Гц (В) и 50 Гц (Г, врезка Д).

Была проведена регистрация ионного тока (voltage-clamp) нейронов, собственный потенциал которых был установлен на отметке -90 мВ. При стимуляции нейронов, экспрессирующих как саTRPA1, так и ео1TRPA1 ионный ток возникал менее, чем за 1 мсек с момента начала стимуляции, и исчезал в течение 1-3 мсек с момента окончания стимуляции, что говорит о практически моментальной активации TRPA1 при температурной стимуляции, сравнимой по кинетике с бактериальными опсинами. В среднем активация саTRPA1 одиночным импульсом вызывает деполяризацию на +15 мВ, входящий ток 0,4 нА, для ео1TRPA1 эти цифры составили +20 мВ, входящий ток 0.5 нА.

Одним из важнейших свойств инструментов для стимуляции клеточной активности являются частотные характеристики работы инструментов и их воспроизводимость. Импульсная стимуляция нейронов сериями 10 мсек импульсов по 20 или 50 импульсов (1342 нм, $E = 1.0$ мДж) и частотой 15, 25 или 50 Гц приводило к стимуляции нейронов, экспрессирующих саTRPA1 с воспроизводимой частотой стимуляции, каждый ПД точно соответствует одному импульсу стимуляции (Рис. 9В, Г, Д). Многие типы нейронов пойкилотермных животных, например, кожные нейроны *Danio rerio*, работают на частотах меньших, чем 50 Гц, что делает саTRPA1 оптимальным и достаточным молекулярным инструментом для стимуляции таких объектов. Надо отметить, что наиболее быстрые оптогенетические инструменты воспроизводят частоты до 100 Гц, так что в нашем случае TRPA1 с ними сравнимы.

Стабильное возникновение ПД при активации канала надпороговой мощностью ИК лазера, воспроизводимость частот активации вплоть до 50 Гц, высокий уровень деполяризации клеток, быстрая кинетика работы канала позволяет сделать вывод о возможности использования TRPA1 змей для стимуляции животных *in vivo*.

2.8. Термогенетическая стимуляция личинок *Danio rerio in vivo*

Конструкции на основе соматосенсорного энхансера z-crest3 гена islet-1 позволили провести специфическую экспрессию TRPA1 в подкожных соматосенсорных нейронах (Рис. 10А,Б) и были использованы для экспериментов по активации у личинок *Danio rerio* поведенческой реакции избегания.

Данная модель основана на стимуляции соматосенсорных нейронов, в норме определяющих тактильную чувствительность личинки. При активации нейронов данной группы личинки делают несколько взмахов хвостом с высокой амплитудой, инстинктивно стремясь избежать механического контакта или опасности.

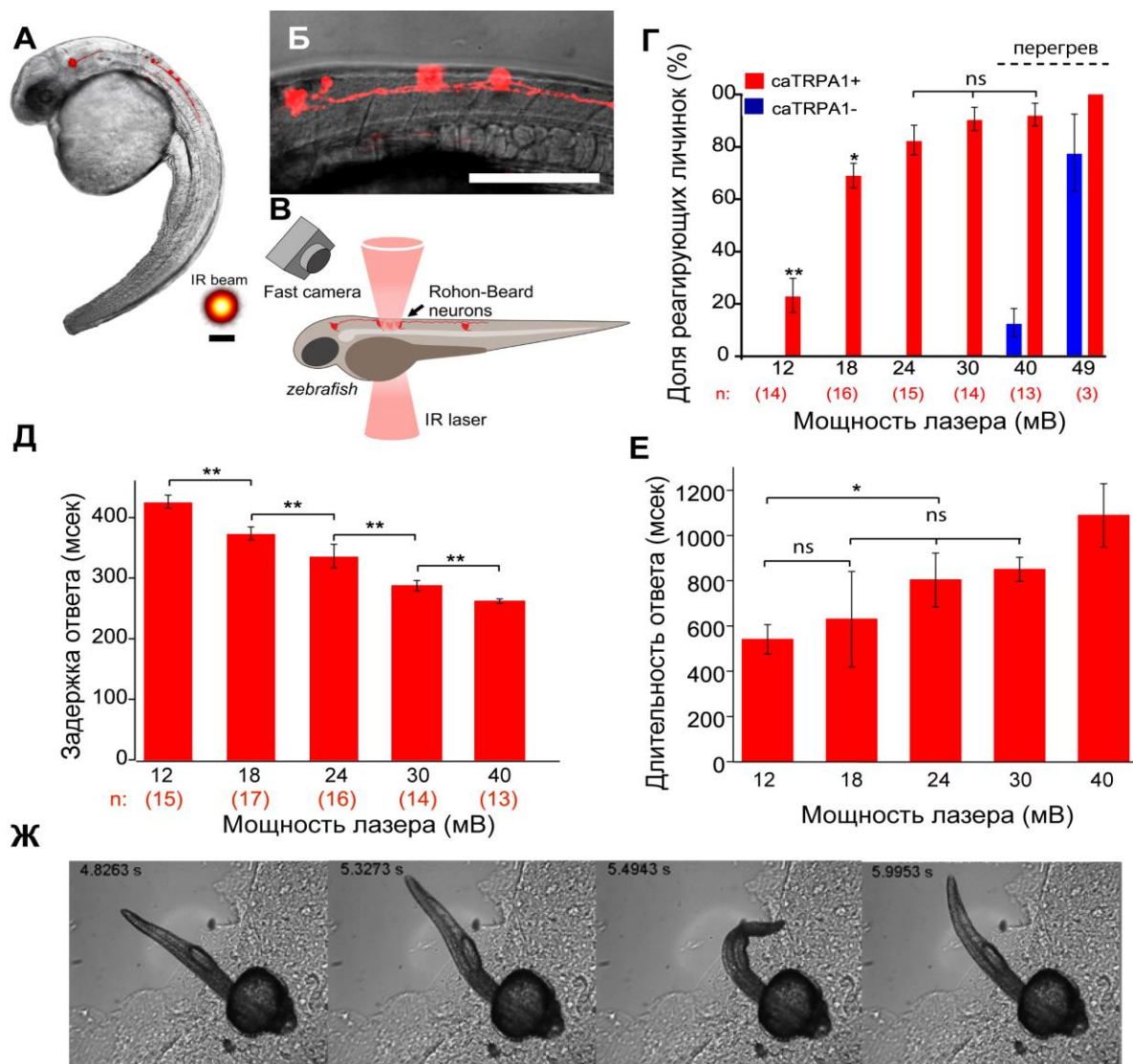


Рисунок 10. Термогенетическая стимуляция поведения избегания у 2х дневных личинок *Danio rerio*. **А)** Схема экспрессии *caTRPA1* в соматосенсорных нейронах *Danio rerio*. **Б)** Флуоресцентное изображение соматосенсорных нейронов, экспрессирующих *caTRPA1* и *tdTomato* под кожей личинки. Масштаб 250 μm **В)** Схема системы регистрации и активации двигательной активности личинки. **Г)** Эффективность активации личинок при различной мощности лазерного излучения (1350 нм). **Д)** Зависимость времени задержки ответа от мощности лазерного излучения. **Е)** Зависимость длительности ответа от мощности лазера. **Ж)** Покадровое представление поведения избегания у личинки с очищенным из агарозного геля хвостом при стимуляции ИК излучением. *n* – число животных в группе, не менее 3х стимуляций на одной мощности для каждого животного. *ns* (*not significant*) – незначимые статистически отличия между группами. Для статистической обработки результатов был использован алгоритм *one-way ANOVA*. * соответствует $p < 0.05$, ** соответствует $p < 0.01$.

Для активации TRPA1 было использовано ИК излучение (1350 нм), сфокусированное в узкий пучок диаметром 60 мкм, «накрывающий» тело индивидуального соматосенсорного нейрона, что позволило стимулировать единичные нейроны личинки *in vivo*. Эффективность стимуляции зависела от мощности излучения (Рис. 10Г), и с сохранением специфичности достигала $93 \pm 3\%$ на мощности 30-40 мВт,

дальнейшее повышение мощности приводило к росту неспецифической активации личинок, контрольных личинок, что может быть связано с активацией собственного термочувствительного канала *Danio rerio* TRPV1. Скорость активации также зависит от мощности ИК излучения, что может быть объяснено ростом скорости нагревания образца, и составляет 288 ± 8 мс до момента начала движения (Рис. 10Д). Это время включает в себя как время нагревания образца до пороговой температуры, активацию канала, генерацию потенциала действия в соматосенсорном нейроне, а также проведение сигнала к миомерам хвоста личинки, что делает его сравнимым с таковым для различных фотоактивируемых. Длительность поведенческого ответа слабо зависит от мощности излучения, и в среднем на одну стимуляцию личинка делает 1-3 взмаха хвостом с высокой амплитудой (Рис. 10Е).

Активация светом длины волны 1342 нм на базе современной оптоволоконной системы активации позволило провести активацию клеток, сравнимую по скорости с активацией наиболее быстрыми инструментами оптогенетики - бактериальными опсинами, но с использованием ИК излучения, менее фототоксического, легче проникающего в ткани за счет сниженного поглощения органических молекул в области ИК (1100-1450 нм).

В ходе данной работы термогенетика впервые была приведена к клеточному разрешению, а временные характеристики метода оказались сравнимыми с таковыми в классической оптогенетической стимуляции. Термогенетика не претендует на полное замещение оптогенетики в арсенале методов регуляции активности клеток, но, как минимум, она является теперь полноценным альтернативным подходом, имеющим свои плюсы и минусы, способным дополнять классические методы оптогенетики.

Выводы

1. Получен красный генетически кодируемый сенсор для детекции пероксида водорода HyPerRed. Основой сенсора являются бактериальный пероксид-чувствительный домен белка OxyR, ранее использованный при создании сенсора HyPer, и красный флуоресцентный белок mApple, подвергнутый круговой пермутации.

2. Спектральные и кинетические характеристики сенсора HyPerRed исследованы в условиях *in vitro* и *in situ*. HyPerRed аналогичен сенсору HyPer по чувствительности и скорости реакции с пероксидом водорода, и в 5.2-раза превосходит его по яркости, и может быть использован для детекции низких концентраций пероксида водорода.

3. Сенсор HyPerRed был использован в условиях физиологической стимуляции продукции пероксида водорода в клетках с помощью эпидермального ростового фактора. Кроме того, с помощью сенсора обнаружен локальный, кратковременный всплеск продукции пероксида водорода в матриксе митохондрий при ингибировании захвата кальция эндоплазматическим ретикулумом. При этом пероксид водорода не распространяется из матрикса в межмембранное пространство митохондрий и цитоплазму клетки.

4. Проведена работа по оптимизации флуоресцентных производных термоактивируемых каналов змей caTRPA1, eo1TRPA1. Наилучшим видом флуоресцентной метки признана автопротеолитическая конструкция TRPA1-P2A-tdTomato. Меченные таким образом каналы имеют локализацию и эффективность стимуляции, не отличающиеся от wtTRPA1. Обнаружен эффект ингибирования активности TRPA1 в клетках HEK293 и нейронах мышцы в культуре при выращивании их на температуре выше пороговой температуры активации каналов, который снимается инкубацией клеток в течение 1 ч на подпороговой температуре. Описаны кинетические и частотные параметры работы TRPA1 змей, и разработана методика стимуляции TRPA1 с помощью инфракрасного излучения для клеток HEK293, нейронов мышцы в культуре и личинок *Danio rerio in vivo*.

5. Проведена *in vivo* стимуляция поведения избегания у 2х-дневных личинок *Danio rerio* с помощью активации термочувствительного канала caTRPA1 и инфракрасного излучения. Была показана высокая эффективность (до 93%) и специфичность стимуляции. Таким образом, термогенетика может быть использована в широком круге приложений в качестве альтернативы оптогенетике.

Список работ, опубликованных по теме диссертации

Статьи

1. **Ermakova, Y. G.**, Bilan, D. S., Matlashov, M. E., Mishina, N. M., Markvicheva, K. N., Subach, O. M., Subach, F. V., Bogeski, I., Hoth, M., Enikolopov, G. & Belousov, V. V. (2014) Red fluorescent genetically encoded indicator for intracellular hydrogen peroxide, **Nature Communications**, 5, 5222.
2. Bilan, D. S., Pase, L., Joosen, L., Gorokhovatsky, A. Y., **Ermakova, Y. G.**, Gadella, T. W., Grabher, C., Schultz, C., Lukyanov, S. & Belousov, V. V. (2013) HyPer-3: a genetically encoded H₂O₂ probe with improved performance for ratiometric and fluorescence lifetime imaging, **ACS Chemical Biology**. 8, 535-42.
3. Fedotov, I. V., Safronov, N. A., **Ermakova, Y. G.**, Matlashov, M. E., Sidorov-Biryukov, D. A., Fedotov, A. B., Belousov, V. V. & Zheltikov, A. M. (2015) Fiber-optic control and thermometry of single-cell thermosensation logic, **Scientific Reports**. 5, 15737.
4. Lanin, A. A., Fedotov, I. V., **Ermakova, Y. G.**, Sidorov-Biryukov, D. A., Fedotov, A. B., Hemmer, P., Belousov, V. V. & Zheltikov, A. M. (2016) Fiber-optic electron-spin-resonance thermometry of single laser-activated neurons, **Optical Letters**. 41, 5563-5566.
5. Matlashov, M. E., Bogdanova, Y. A., Ermakova, G. V., Mishina, N. M., **Ermakova, Y. G.**, Nikitin, E. S., Balaban, P. M., Okabe, S., Lukyanov, S., Enikolopov, G., Zraisky, A. G. & Belousov, V. V. (2015) Fluorescent ratiometric pH indicator SypHer2: Applications in neuroscience and regenerative biology, **Biochimica et Biophysica Acta**. 1850, 2318-28.
6. Safronov, N. A., Fedotov, I. V., **Y. G. Ermakova**, Matlashov, M. E., Sidorov-Biryukov, D. A., Fedotov, A. B., Belousov, V. V. & Zheltikov, A. M. (2015) Microwave-induced thermogenetic activation of single cells, **Applied Physics Letters**. 106, 163702-4.
7. Schwarzlander, M., Wagner, S., **Ermakova, Y. G.**, Belousov, V. V., Radi, R., Beckman, J. S., Buettner, G. R., Demaurex, N., Duchon, M. R., Forman, H. J., Fricker, M. D., Gems, D., Halestrap, A. P., Halliwell, B., Jakob, U., Johnston, I. G., Jones, N. S., Logan, D. C., Morgan, B., Muller, F. L., Nicholls, D. G., Remington, S. J., Schumacker, P. T., Winterbourn, C. C., Sweetlove, L. J., Meyer, A. J., Dick, T. P. & Murphy, M. P. (2014) The 'mitoflash' probe cpYFP does not respond to superoxide, **Nature**. 514, E12-4.

Патенты

1. Патент РФ № 0002535336 С1. Белоусов Всеволод Вадимович, Ениколопов Григорий Николаевич, **Ермакова Юлия Геннадиевна**. Красный флуоресцентный биосенсор для детекции пероксида водорода в живых клетках.

Тезисы докладов на конференциях

1. **Y. G. Ermakova**, D. S. Bilan, N. Mishina, K.N. Markvicheva, G. Enikolopov and V. V. Belousov. Genetically encoded red fluorescent probe for intracellular H₂O₂ detection. «Mechanisms in Biology», 2013, **The 38th FEBS Congress**, 2013, St. Petersburg, Russia.
2. Bilan D, **Ermakova Y**, Mishina N, Matlashov M, Subach O, Subach F, Schultz C, Enikolopov G, Belousov V. Expanding a HyPer family of genetically encoded redox probes. «Seeing is Believing – Imaging the Processes of Life» **EMBO/EMBL Symposia**, 2013, Hiedelberg, Germany.
3. **Y. G. Ermakova**, D. S. Bilan, M. E. Matlashov, N. M. Mishina, K. N. Markvicheva, O. M. Subach, F. V. Subach, I. Bogeski, M. Hoth, G. Enikolopov, V. V. Belousov. Multiparametric redox imaging in different cellular compartments. «From molecules to cells», 2014, **The 39th FEBS Congress**, 2014, Paris, France.
4. **Y. G. Ermakova**, D. S. Bilan, M. E. Matlashov, N. M. Mishina, K. N. Markvicheva, O. M. Subach, F. V. Subach, I. Bogeski, M. Hoth, G. Enikolopov, V. V. Belousov. Multiparametric redox imaging in different cellular compartments. «Healthy aging», 2014, **SFRR-E Spetses Summer School**, Spetces, Greece.
5. **Y. G. Ermakova**, D. S. Bilan, M. E. Matlashov, N. M. Mishina, K. N. Markvicheva, O. M. Subach, F. V. Subach, I. Bogeski, M. Hoth, G. Enikolopov, V. V. Belousov. Multiparametric redox imaging in different cellular compartments, 2015, **EMBL Bioimaging Master Course reports**, Heidelberg, Germany.
6. **Ермакова Ю.Г.**, Ланин А.А., Федотов И.В., Роцин М.В., Кулик Д. С., Богданова Ю.А., Кельмансон И.В., Шохина А.Г., Билан Д.С., Староверов Д.Б., Никитин Е.С., Жёлтиков А.М., Белоусов В.В. Термогенетическая активация нейронов с клеточным разрешением. **V съезд биохимиков России**, 2016, Сочи, Россия.
7. **Ермакова Ю.Г.**, Ланин А.А., Жёлтиков А.М., Белоусов В.В. Термогенетическая активация нейронов с клеточным разрешением. «Перспективные направления физико-химической биологии и биотехнологии», **XXIX Зимняя молодежная научная школа ИБХ РАН**, 2017, Москва, Россия.