

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 «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. В данной диссертационной работе описана разработка и тестирование 2-х инструментов: красного генетически-кодируемого сенсора для детекции пероксида водорода HyPerRed, а также применения термоактивируемых каналов змей TRPA1 в сочетании с СВЧ или ИК излучением для стимуляции клеток с помощью деполяризации и входа кальция.

Структура диссертационной работы соответствует общепринятым нормам. Работа изложена на 135 страницах, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, а также списка цитируемой литературы из 299 ссылок, снабжена богатым иллюстративным материалом (содержит 41 рисунок и 2 таблицы). Материалы диссертации изложены последовательно, результаты каждого раздела диссертационной работы взаимно дополняют и логически развивают положения, установленные автором ранее.

В первой части обзора литературы Ермакова Ю.Г. дает подробное описание структуры GFP-подобных флуоресцентных белков, их свойств, а также создании первых генетически-кодируемых сенсоров. Вторая часть

(литобзора посвящена развитию методов оптогенетики и термогенетики. Обзор литературы дает исчерпывающее представление о теме, актуальности и предыстории работы.

В следующем разделе описаны примененные в работе методы. Современный уровень использованных методов не вызывает сомнений. Особо следует отметить многообразие методов, которые охватывают следующие области: клонирование ДНК-конструкций и молекулярную биологию, работу с изолированными белками, клеточную биологию с использованием современных методов микроскопии, patch-clamp, а также микроинъекцию эмбрионов *Danio rerio*. Это свидетельствует о высоком квалификационном уровне диссертационной работы и самого автора.

Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из 2-х частей и построен по четкой логической схеме. По результатам первой части работы был создан красный генетически-кодируемый сенсор HyPerRed, описана его чувствительность, динамический диапазон как на выделенном белке, так и при экспрессии в клетках эукариот и прокариот. HyPerRed был применен для детекции пероксида водорода в клетках Hela Kyoto при стимуляции EGF, а также в клетках HEK293 при стимуляции тапсигаргином, что позволило обнаружить короткий всплеск продукции пероксида водорода в процессе стимуляции, не распространяющийся в другие компартменты митохондрий, и не связанный с изменениями pH или соотношения окисленного/восстановленного глутатиона. Во второй части рассмотрено применение термоактивируемых каналов змей TRPA1 для стимуляции поведения избегания у личинок *Danio rerio*, а также описаны или проанализированы параметры работы этих каналов в нейронах мыши. Результаты данной работы показывают, что TRPA1 не сильно уступают бактериальным опсинам, основным быстрым инструментам оптогенетики, и могут быть использованы в качестве альтернативного инструмента стимуляции клеток, а также областей коры головного мозга *in vivo*.

Полученные в ходе работы данные показывают, что разработанные методы детекции и стимуляции процессов в нейронных сетях могут быть использованы в процессе регистрации пероксида водорода, а также стимуляции кальциевых всплесков в различных моделях *in vivo*.

Логичным продолжением данной работы представляется увеличение яркости HyPerRed, а также применение TRPA1 для стимуляции поведения у теплокровных животных.

В процессе изучения диссертации были замечены незначительные опечатки и неточности. Однако это не снижает хорошего впечатления от диссертационной работы.

Заключение

Диссертационная работа Ермаковой Ю.Г. является законченным научным исследованием. Результаты диссертационной работы докладывались на международных и российских научных конференциях и опубликованы в авторитетных российских и зарубежных журналах. Полученные автором результаты достоверны, заключения и выводы обоснованы. Полученный флуоресцентный сенсор HyPerRed получил практическое применение и используется в различных исследованиях во многих профильных учреждениях по всему миру. Термоактивируемые каналы TRPA1 по результатам введены в практику в нескольких лабораториях в процессе работы над диссертацией, и можно ожидать расширения спектра их применения. Результаты работы имеют большое значение для биологических исследований в области клеточного сигналинга и нейробиологии. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации и оформлен надлежащим образом.

Диссертационная работа полностью 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,
заведующий лабораторией «Изучения информационных процессов
на клеточном и молекулярном уровнях»

Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича Российской
академии наук.



Панчин Юрий Валентинович

Контактная информация:

Почтовый адрес: 127051, г. Москва, Большой Каретный переулок, д.19 стр. 1.

Телефон: +7 (495) 939-41-95

E-mail: ypanchin@yahoo.com