

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Соколинской Елены Леонидовны

«Визуализация локализации и активности индивидуальных белков коронавируса SARS-CoV-2 в культурах клеток человека», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Диссертационная работа Соколинской Е.Л. посвящена разработке безопасных клеточных систем для изучения белков SARS-CoV-2 с использованием методов флуоресцентной микроскопии. Вирус SARS-CoV-2 стал причиной глобальной пандемии в 2020-2021 годах. Несмотря на создание вакцин, новые формы вируса, возникающие вследствие его постоянной эволюции, все еще представляют угрозу для здоровья людей, снижая эффективность уже существующих методов лечения. В связи с этим, высокую актуальность представляет поиск и разработка препаратов, которые оказывают ингибирующее воздействие на отдельные белки коронавируса. Для тестирования веществ-ингибиторов и изучения свойств отдельных белков SARS-CoV-2 необходима разработка безопасных и доступных в условиях лабораторий клеточных моделей для проведения экспериментов. Методы, основанные на применении флуоресцентной микроскопии, являются одним из перспективных подходов для решения данной задачи. Технология флуоресцентной микроскопии позволяет работать с живыми клетками, отслеживая динамику интересующих процессов в реальном времени с высокой чувствительностью и специфичностью.

Диссертационная работа Соколинской Е.Л. выполнена по классическому плану и содержит следующие разделы: Список сокращений, Введение, Обзор литературы, Материалы и методы, Описание полученных результатов и их обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы. Работа изложена на 123 страницах и включает 48 рисунков, список цитируемой литературы состоит из 203 ссылок.

Раздел «Обзор литературы» состоит из трех частей. В первой части представлены основные сведения о пандемии COVID-19, включая патогенез инфекции. Также в этой части литературного обзора приводится подробное описание жизненного цикла коронавируса, включая сведения о структурных белках и протеазах SARS-CoV-2. Отдельное внимание уделено значению М-белка в формировании структуры вириона. Во втором подразделе приведены базовые сведения о генетически кодируемых флуоресцентных сенсорах: представлено описание основных классов биосенсоров на основе флуоресцентных белков, принципы их работы и примеры использования для

решения различных научных задач. В третьей части литературного обзора отдельно рассмотрены генетически кодируемые сенсоры на протеазы и приведены примеры их использования.

В главе «Материалы и методы» приводится подробное описание всех экспериментальных подходов, используемых автором. Настоящая работа была выполнена с использованием большого арсенала методов молекулярной и клеточной биологии, включая сборку генно-инженерных конструкций по системе MoClo, инфицирование эукариотических клеток вирусом SARS-CoV-2, иммуноцитохимию, а также методы флуоресцентной микроскопии и обработки изображений.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из двух разделов, в которых изложены основные результаты работы. Первый раздел главы посвящен исследованию внутриклеточной локализации М-белка SARS-CoV-2 при помощи флуоресцентной микроскопии. Помимо локализаций, продемонстрированных в научных статьях, автором была впервые обнаружена и продемонстрирована тенденция рекомбинантного М-белка к олигомеризации в клетках человека. При экспрессии в линии HEK293T в некоторых клетках М-белок локализовался в виде «стопок» мембран в ЭПР, напоминающих так называемые OSER-структуры, что свидетельствует о межмембранной олигомеризации молекул белка. По мнению автора, подобная олигомеризация М-белка может служить движущей силой при почковании зрелых вирионов. При экспрессии М-белка в линии HeLa в некоторых клетках обнаруживались жесткие филаментоподобные структуры неизвестной природы длиной около 10 мкм, которые отчетливо выявлялись в ходе флуоресцентной и фазово-контрастной микроскопии. В ходе экспериментов автором было выяснено, что данные структуры не связаны с цитоскелетом и предположительно возникают из мембраны ЭПР. По мнению автора, потенциальной движущей силой для формирования подобных структур также может служить олигомеризация М-белка, происходящая вследствие реорганизации мембран ЭПР в ходе инфекции.

Вторая часть главы «Результаты и обсуждение» посвящена разработке генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров для изучения активности коронавирусной протеазы PLpro. В настоящей работе были впервые созданы и протестированы дальнекрасный FRET-сенсор для детекции активности растворимой PLpro и три типа транслокационных биосенсоров для мембран-ассоциированной PLpro.

В первом подразделе автор описывает результаты работы FRET-сенсора, в основе дизайна которого лежит использование красного белка mScarlet (донор) и дальнекрасного белка miRFP670 (акцептор), разделенных линкером, содержащим сайт узнавания протеазы. В системе с активной протеазой разрезание сайта приводило к снижению FRET-сигнала и

увеличению флуоресценции донора: соотношение сигналов донор/акцептор увеличивалось в 1,3–1,6 раза в течение нескольких часов после индукции экспрессии PLpro в клетках человека.

Во втором подразделе продемонстрированы результаты экспериментов с транслокационными сенсорами, дизайн которых основан на использовании зеленого белка mNeonGreen и красного белка mScarlet I, разделенных линкером с сайтом узнавания протеазы. В рамках данной работы автором было сконструировано три варианта транслокационных сенсоров, различающихся по способу связывания с мембраной ЭПР. Также были разработаны генетические конструкции для экспрессии рекомбинантной протеазы PLpro с несколькими типами локализаций на мембране ЭПР. Первый вариант сенсора PLpro-sensor-TA на С-конце молекулы содержал так называемый «хвостовой якорь» TA, направляющий биосенсор на цитозольную сторону мембраны ЭПР. Такой же сигнал ЭПР-локализации был использован в генетической конструкции для экспрессии протеазы. Для проведения количественной оценки работы сенсора автор использовал соотношение сигналов в ядре и цитоплазме в красном канале, нормированное на соотношение сигналов в ядре и цитоплазме в зеленом канале для одних и тех же областей интереса. Полученное значение параметра увеличивалось примерно в 2 раза в клетках с активной протеазой по сравнению с контрольными клетками.

При конструировании второго варианта сенсора PLpro-sensor-Plus была использована часть молекулы неструктурного белка nsp3, отвечающая за ассоциацию коронавируса полипротеина с ЭПР клетки-хозяина. Для направления генетической конструкции для экспрессии PLpro на мембрану ЭПР также была использована часть молекулы nsp3. Данная особенность позволяет точно имитировать естественное положение каталитического домена PLpro и сайтов-мишеней протеазы относительно мембраны ЭПР, создавая максимально приближенные к нативным условия эксперимента. Рассчитанное соотношение сигналов для PLpro-sensor-Plus также увеличилось примерно в 2 раза в клетках, содержащих активную PLpro, по сравнению с контрольными клетками.

Третий вариант сенсора PLpro-ERNuc представляет из себя модернизированную версию конструкции PLpro-sensor-Plus, на С-конец которой был добавлен сигнал ядерной локализации NLS. В результате зеленый сигнал в ходе протеолиза не диссипировал в цитоплазме, а накапливался в ядре после расщепления линкера протеазой. Это позволило увеличить динамический диапазон работы биосенсора в 7 раз по сравнению с предыдущими вариантами конструкций: рассчитанное соотношение сигналов для PLpro-ERNuc увеличилось примерно в 14 раз в клетках, содержащих активную PLpro, по сравнению с контрольными клетками. В результате дизайн PLpro-ERNuc был признан

автором как наиболее успешный и был дополнительно протестирован в клеточной модели инфекции SARS-CoV-2. В данном эксперименте разрезание линкера должно было происходить в результате работы PLpro вирусного происхождения, которая нарабатывалась в ходе репликации SARS-CoV-2 в культуре клеток человека, экспрессирующих сенсор. Конфокальная флуоресцентная микроскопия экспериментальных образцов показала накопление зеленого сигнала в ядре спустя 24 часа после заражения вирусом. В то же время, при обработке зараженных клеток вирусным ингибитором молниепировирусом, изменения локализации зеленого сигнала не происходило. Это позволяет заключить, что наблюдаемая транслокация происходит в результате разрезания линкера в составе сенсора вирусной протеазой, что подтверждает возможность применения PLpro-ERNuc для обнаружения инфекции в культуре клеток. Таким образом PLpro-ERNuc продемонстрировал результат как на модели с рекомбинантной протеазой, так и на модели инфекции SARS-CoV-2, и потенциально может быть применен для изучения свойств или скрининга ингибиторов PLpro.

Диссертационная работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». В разделе «Заключение» автор приводит краткое обобщение полученных результатов, обосновывая их теоретическую и практическую значимость. Приведенные выводы являются достоверными и обоснованными и полностью соответствуют поставленным задачам.

Результаты диссертационной работы Соколинской Е.Л. были опубликованы в 3 научных статьях в рецензируемых журналах и представлены в 2 тезисах докладов на международных конференциях.

По работе необходимо отметить следующие неточности:

- 1) В разделе FRET-сенсоры автор пишет, что FRET «представляет собой физическое явление переноса энергии между двумя хромофорами, спектры которых перекрываются менее чем на 10 нм». По-видимому, автор имел в виду, что ферстеровский радиус для диполь-дипольных взаимодействий составляет величину порядка 10 нм. А перекрывание является интегральной величиной в определенной степени связанной со сдвигом между спектром флуоресценции донора и поглощения акцептора, однако никакого критерия, связанного с величиной этого сдвига нет.
- 2) Хотя в тексте диссертации указывается, что FRET-сенсор на протеазу PLpro получен на основе аналогичного сенсора на каспазу 3 путем замены DEVD на LKGG следовало бы указать полную структуру линкера с точным указанием, какая пептидная связь и между какими аминокислотными остатками

расщепляется, тем более что в транслокационном сенсоре указан значительно более длинный сайт распознавания с повторяющимися аминокислотными (лизин) остатками.

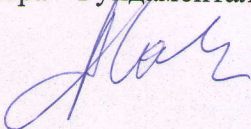
- 3) Для оценки эффективности FRET на рисунке 41 автор использовал радиометрический метод, основанный на измерении соотношения интенсивности флуоресценции донора и акцептора. И хотя контроль колеблется приблизительно на одном уровне, такой метод не учитывает кинетику и полноту созревания флуоресцентного белка de novo и фото обесцвечивание обеих флуоресцентных меток при измерении в двух разных каналах в течении столь длительного промежутка измерений. В таких сложных системах более надежным было бы измерение эффективности FRET по времени жизни донора в возбужденном состоянии.
- 4) В автореферате следовало бы привести список сокращение с расшифровкой, таких как, например, mAvicFP1-ER и OSER-структуры, смысл которых без чтения текста диссертации не понятен.

Указанные замечания не изменяют общую положительную оценку диссертационной работы.

Диссертационная работа Соколинской Елены Леонидовны соответствует критериям (в том числе п. 9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. № 426; 11.09.2021 №1539), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент

Заведующий лабораторией физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха
Федерального исследовательского центра "Фундаментальные основы биотехнологии"
Российской академии наук
профессор, д.х.н.
27 ноября 2024

 Савицкий Александр Павлович

119071, Москва,
Ленинский проспект 33, корпус 2
Тел. +7(495)9548725. E-mail: apsavitsky@mbr.ras.ru

Подпись д.х.н. Савицкого А.П.
«Удостоверяю»
Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН
к.б.н.



 Орловский Александр Федорович