

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт биологии гена Российской академии наук
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334

Тел.: (499)135-60-89, (499)135-98-84 Факс: (499)135-41-05

e-mail: info@genebiology.ru; <http://www.genebiology.ru>

ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН/ КПП 7736020369/773601001

08 ноября 2024

№ 12318 - 224

На №

от



«УТВЕРЖДАЮ»

Директор ИБГ РАН

академик РАН Георгиев П.Г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Елены Леонидовны Соколинской
«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

Актуальность темы выполненной работы

Вирус SARS-CoV-2, ставший причиной глобальной пандемии в истории человечества, вызывает тяжелую респираторную инфекцию COVID-19. Эволюция вируса и появление новых штаммов приводят к постепенному снижению эффективности существующих вакцин. Всё более актуальной становится разработка препаратов, оказывающих ингибирующее воздействие на отдельные белки SARS-CoV-2 и стадии жизненного цикла вируса, с тем чтобы облегчить течение инфекции у пациентов. Этот подход требует разработки безопасных систем, позволяющих моделировать отдельные аспекты функционирования вируса в лабораторных условиях, что однозначно делает крайне актуальными такие разработки. Работа Е.Л. Соколинской направлена на разработку методов для изучения отдельных белков SARS-CoV-2 в безопасных клеточных

модельных системах с использованием флуоресцентной микроскопии. Используемая диссертантом флуоресцентная микроскопия позволяет получать данные в высоком разрешении (как в пространстве, так и во времени), поэтому является перспективным инструментом изучения молекулярных механизмов на уровне единичных живых клеток. Разработанные Е.Л. Соколинской подходы в дальнейшем могут быть использованы в качестве скрининговых платформ для потенциальных веществ-ингибиторов SARS-CoV-2.

Научная новизна и научно-практическая значимость полученных результатов

В данной работе впервые была продемонстрирована тенденция нативного М-белка SARS-CoV-2 к формированию олигомеров в клетках человека, которая в клеточной линии HEK293T выявлялась в виде OSER-структур, а в клеточной линии HeLa – в виде стержнеобразных структур длиной порядка 10 мкм. Автор предполагает, что подобная олигомеризация может играть важную роль в формировании и отпочковывании вирусных частиц, на основании чего полученная модельная система потенциально может быть использована для тестирования веществ-ингибиторов М-белка и более детального изучения самого феномена. Также в рамках данной работы автором были разработаны генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры для изучения активности протеазы PLpro SARS-CoV-2. В данной работе был разработан первый генетически кодируемый FRET-сенсор для растворимой PLpro, а также первый транслокационный биосенсор для мониторинга активности мембран-ассоциированной PLpro, представленный в трех вариантах дизайна. Все варианты биосенсоров продемонстрировали эффективную работу в клетках человека, что также дает возможность в перспективе строить на их основе модельную систему для тестирования ингибиторов.

Общая характеристика и структура диссертационной работы

Работа построена по стандартной схеме и содержит введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы. Текст изложен на 123 страницах, содержит 48 рисунков и 203 ссылки на использованную литературу.

Введение содержит описание цели и задач исследования, актуальности, новизны и практической значимости полученных результатов. Приведена информация об опубликованных по теме исследования научных статьях и тезисах научных докладов на конференциях.

Обзор литературы разделен на три подраздела. Первый посвящен описанию жизненного цикла SARS-CoV-2, его структурных белков и протеаз. Во втором рассмотрены генетически кодируемые сенсоры, их принцип работы и основные преимущества. В третьем подразделе автором описаны существующие на сегодняшний день генетически кодируемые сенсоры для коронавируса протеаз. В целом, литературный обзор дает достаточно хорошее представление о тематике исследования.

Раздел **Материалы и методы** содержит необходимую информацию о молекулярно-генетических методах и методах работы с культурами эукариотических клеток, использованных автором в работе. Также приведено описание методов флуоресцентной микроскопии и последующей обработки полученных изображений.

В разделе **Результаты и обсуждение** описаны полученные экспериментальные результаты и дана их интерпретация. С использованием методов прижизненной флуоресцентной микроскопии автор описывает проведение экспрессии М-белка SARS-CoV-2 в клетках человека. При экспрессии нативного М-белка в клетках HEK293T была выявлена ранее не описанная тенденция М-белка к образованию межмембранных олигомеров, выражающаяся в формировании округлых структур размером до 5 мкм в сети ЭПР. При экспрессии нативного М-белка в клетках HeLa, помимо локализаций М-белка, проиллюстрированных в научных статьях, в части клеток автором были обнаружены филаментоподобные структуры неизвестной природы.

При помощи методов флуоресцентной микроскопии автором было выяснено, что длина структур лежит в диапазоне 7-15 мкм. Кроме того, наличие колокализации с маркером ЭПР говорит о возможной ассоциации филаментов с ретикулярной сетью. На основании полученных результатов автор предполагает, что филаменты имеют мембранное происхождение и возникают вследствие частичной реорганизации ЭПР в ходе экспрессии М-белка.

Далее в разделе «Результаты и обсуждение» автор описывает сконструированные генетически кодируемые сенсоры на протеазу PLpro и приводит результаты тестирования

полученных конструкций в клетках млекопитающих. В основе дизайна всех биосенсоров лежит использование двух флуоресцентных белков, разделенных линкером, содержащим сайт узнавания протеазой. При конструировании сенсора на основе FRET в качестве донора был использован красный белок mScarlet, а в качестве акцептора – дальнекрасный белок mRFP670. При экспрессии биосенсора в клетках человека соотношение сигналов донор/акцептор постепенно увеличивалось в 1,3–1,6 раза в течение нескольких часов после индукции экспрессии PLpro. На основании данных результатов Е.Л. Соколинская заключила, что разработанный биосенсор может быть использован для специфической оценки активности PLpro на основе FRET-взаимодействия флуоресцентных белков в составе конструкции.

Другой тип биосенсоров, предназначенный для изучения активности мембраноассоциированной PLpro, был основан на использовании принципа транслокации. В рамках данной работы автором было сконструировано три типа транслокационных биосенсоров, в основе дизайна которых лежит использование зеленого белка mNeonGreen и красного белка mScarlet I, разделенных сайтом узнавания протеазой. Все сенсоры были заякорены на мембране ЭПР. При наличии активной протеазы происходило разрезание сайта, в результате чего один из флуоресцентных белков изменял свою локализацию, инициируя транслокацию флуоресцентного сигнала. Для оценки эффективности работы сенсоров оценивалось изменение соотношения флуоресцентного сигнала ядро/цитоплазма в красном и зеленом каналах в клетках с активной протеазой по сравнению с контрольными клетками. В первом варианте биосенсора, PLpro-sensor-TA, для заякоривания молекулы на мембране ЭПР на С-конец конструкции был добавлен короткий «хвостовой якорь» (TA, tail anchor), и в присутствии активной протеазы соотношение сигналов увеличивалось примерно в 2 раза. Во втором варианте биосенсора, PLpro-sensor-Plus, для ассоциации мембраной ЭПР использовался трансмембранный участок молекулы белка nsp3, в состав которого входит домен PLpro. Подобный дизайн позволил смоделировать реальное расположение каталитического домена PLpro и его мишени во внутриклеточном пространстве относительно мембраны ЭПР при инфекции. В клетках с активной протеазой соотношение сигналов также увеличивалось примерно в 2 раза по сравнению с контрольными клетками. В третьем варианте транслокационного биосенсора, PLpro-ERNuc, на С-конец молекулы был дополнительно добавлен сигнал ядерной локализации NLS, что обеспечивало аккумуляцию зеленого сигнала в ядре в ходе

транслокации. Данная особенность позволила значительно увеличить динамический диапазона работы сенсора – соотношение сигналов в системе с рекомбинантной протеазой увеличивалось примерно в 14 раз по сравнению с контрольными клетками. Полученный биосенсор PLpro-ERNuc был дополнительно протестирован в экспериментальной модели культуры клеток Huh7.5, зараженных SARS-CoV-2. В данной системе разрезание сайта в составе сенсора должно было происходить в результате работы вирусной протеазы. Спустя 24 часа после инфицирования в клетках наблюдалась искомая транслокация зеленого сигнала из сети ЭПР в ядро. При обработке зараженных клеток молниепиривиром транслокации не происходило, что подтверждает гипотезу о том, что изменение локализации флуоресцентного сигнала происходило в результате работы вирусной протеазы.

Вопросы и замечания

1. В главе 4.2.2.3 PLpro-ERNuc на странице 101 автор описывает эксперимент, в котором клетки линии Huh7.5, экспрессирующие сенсор PLpro-ERNuc, были заражены SARS-CoV-2. Выбор клеточной линии для эксперимента автор объясняет тем, что в работе (Smirnova et al., 2023) было продемонстрировано, что SARS-CoV-2 способен эффективно заражать линии опухолевых клеток печени. Желательно пояснить причины, по которым эти опухолевые клетки печени являются чувствительными к заражению вирусом SARS-CoV-2.
2. На стр. во фразе «Этот факт согласуется с результатами более ранних исследований, где при помощи криоэлектронной микроскопии оболочки SARS-CoV-2 была выявлена способность димеров М образовывать структуры, напоминающие решетку [67,74]» неточность: цитируемые авторы (Neuman et al., 2006, 2011) исследовали не вирус SARS-CoV-2, а другие коронавирусы: SARS-CoV, FCoV и MHV.

Заключение

Результаты работы могут быть использованы в молекулярно-биологических исследованиях, которые проводятся в ряде институтов Министерства здравоохранения РФ, а также в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте белка Российской академии наук, Федеральном

государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте биохимии Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте цитологии и генетики СО Российской академии наук, Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Институте молекулярной и клеточной биологии СО Российской академии наук и др.

По содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической и теоретической значимости полученных результатов, диссертация Соколинской Е.Л. полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. №842, представляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Соколинская Елена Леонидовна, несомненно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 Молекулярная биология.

Отзыв на диссертационную работу Соколинской Елены Леонидовны «Визуализация локализации и активности индивидуальных белков коронавируса SARS-CoV-2 в культурах клеток человека» был обсужден и одобрен на семинаре лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук 07 ноября 2024 года (протокол № 1).

Заведующий лабораторией
молекулярной генетики
внутриклеточного транспорта ИБГ РАН
член-корреспондент РАН,
доктор биологических наук,
профессор
E-mail: alexander.s.sobolev@gmail.com


СОБОЛЕВ Александр Сергеевич

