

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Меркульевой Юлии Александровны «Свойства рекомбинантного рецептор-связывающего домена S-белка SARS-CoV-2, полученного в клетках CHO-K1», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология»

Актуальность темы. Впервые выявленный несколько лет назад новый коронавирус SARS-CoV-2, вызвал пандемию, которая продолжается до настоящего времени и оказала большое влияние на общество и экономику во всем мире. Характерной чертой этой пандемии является быстрое возникновение новых генетических вариантов вируса, что в первую очередь, обусловлено его биологическими особенностями и осложняет разработку способов борьбы с вирусом. Для проникновения в клетки SARS-CoV-2 использует поверхностный S-белок, взаимодействие рецептор-связывающего домена (RBD) которого с ангиотензин-превращающим ферментом 2 (ACE2) на поверхности целевой клетки вызывает конформационные изменения в структуре S-белка и запускает проникновение вируса в клетку. В результате исследования иммунного ответа на коронавирусы у людей было установлено, что формирование иммунного ответа, направленного именно на RBD район S-белка способно обеспечить эффективную защиту. В совокупности это говорит о том, что RBD выполняет крайне важную роль в инфицировании. Также стоит отметить, что выделенный RBD может использоваться для разработки тест-систем для детекции антител и RBD S-белка в биологических образцах, разработки стратегий блокирования проникновения вируса в клетки, а также на основе RBD были разработаны и одобрены к применению ряд вакцин. Несмотря на то, что с момента обнаружения вируса было проведено большое количество исследований, до сих пор остается множество вопросов и крайне актуальными являются работы, посвященные изучению молекулярных механизмов инфицирования клеток вирусом, разработке вакцин против COVID-19, диагностических тест-систем и эффективных средств терапии и профилактики.

Диссертационная работа Меркульевой Юлии Александровны посвящена получению рекомбинантного рецептор-связывающего домена (RBD) S-белка вируса SARS-CoV-2 в клеточной линии CHO-K1 и изучению его структуры, некоторых физико-химических и иммунологических свойств. Таким образом данное исследование на сегодняшний день является актуальным и значимым как в практическом, так и теоретическом отношении.

Научная новизна исследования состоит в том, что в диссертационной работе на основе оригинального плазмидного вектора pVEAL2-RBD и клеточной линии яичника китайского хомячка CHO-K1 получен новый продуцент CHO-K1-RBD, обеспечивающий

стабильную секрецию RBD SARS-CoV-2 в культуральную среду и, позволяющий получать до 100 мг белка с литра культуральной среды при роллерном культивировании. Выделен рекомбинантный RBD белок и охарактеризована его структура, а также антигенные, иммуногенные и некоторые физико-химические свойства. На основе оценки иммуногенности RBD SARS-CoV-2 на разных модельных животных, показан феномен слабо выраженного гуморального иммунного ответа на RBD у сирийских хомячков. Разработан адъювант, который усиливает специфический гуморальный и Т-клеточный иммунные ответы на RBD у мышей линии BALB/c.

Теоретическая и практическая значимость. В ходе выполнения работы были получены данные о структуре, свойствах и особенностях рекомбинантного RBD (a.o. V308-541F) S-белка SARS-CoV-2 которые могут представлять интерес при разработке вакцин против COVID-19. Получена клеточная линия CHO-K1-RBD – продуцент рекомбинантного белка RBD, которая депонирована в банк Коллекции культур клеток ГИЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора, на изобретение получен патент РФ №2752858. Данная линия может быть использована для производства белка RBD с целью создания ИФА тест-систем, а также вакцин.

Достоверность и обоснованность результатов исследования. Экспериментальная работа в рамках диссертации Меркульевой Ю.А. хорошо продумана и логична, выполнена с использованием методов молекулярной биологии, иммунологии, вирусологии, методов работы с животными и культурами клеток млекопитающих, а также физико-химических методов анализа белка. В работе использовались общепринятые методики адаптированные в соответствии с поставленными целью и задачами исследования. Выборки по повторность экспериментов достаточны для статистической обработки. Положения, выносимые на защиту, и выводы являются достоверными и обоснованными.

Структура и содержание диссертации. Диссертационная работа логично построена, написана четким, понятным языком, изложена на 122 страницах машинописного текста, включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов, результаты исследования, обсуждение результатов, заключение, выводы, список цитируемой литературы, состоящий из 226 источников, в основном опубликованных в зарубежных журналах, значительная часть из которых опубликована в 2020-2022 годах. Работа включает 26 рисунков, 5 таблиц и 2 приложения, которые улучшают понимание обзора литературы и отражают полученные автором результаты.

В разделе «Введение» автор описывает проблему, обосновывает актуальность исследования, формулирует цель и задачи, которые необходимо решить для ее достижения.

Также сформулированы положения, выносимые на защиту, новизна и значимость диссертационной работы, отражены личный вклад автора, степень достоверности и апробация результатов.

В главе «Обзор литературы» представлены данные о современном состоянии изучаемого вопроса. Описаны строение и жизненный цикл коронавирусов, структура и роль S-белка и его рецептор-связывающего домена RBD в развитии иммунного ответа, а также возможности использования RBD в разработке подходов противодействия COVID-19. Обзор изложен логично, четко и хорошо проиллюстрирован.

В главе «Материалы и методы» в достаточной для воспроизведения мере описаны основные использованные в работе материалы и методики биохимии, генной инженерии, молекулярной и клеточной биологии. Выбор методов соответствует задачам и обоснован.

В главе «Результаты исследования» подробно описаны и проиллюстрированы результаты диссертационного исследования, которые изложены в соответствии с поставленными задачами. В ходе выполнения исследования был сконструирован новый плазмидный вектор pVEAL2-RBD, в который был встроен ген, кодирующий фактор резистентности к пурамицину (взамен Zeocin) для ускорения селективного отбора трансформантов, а также фрагмент ДНК, кодирующий домен RBD S-белка (а.о. 308V-541F) SARS-CoV-2, с дополнительными последовательностями, кодирующими сигнальный пептид S-белка и 10×his-метку на 5'- и 3'- концах соответственно. На основе полученного плазмидного вектора и клеточной линии CHO-K1 был получен продуцент CHO-K1-RBD, который обеспечивает секрецию RBD-белка в культуральную среду. Далее был выделен рекомбинантный белок RBD и охарактеризована его структура и некоторые физико-химические свойства. Вторичная структура RBD представлена антипараллельными β -складчатыми структурами (31,1%), α -спиралями (15,9%) и поворотами (7,2%). Молекула RBD имеет максимальный диаметр равный 8,3 нм и радиус вращения равный 2,48 нм. Температура плавления RBD составляет $47,82 \pm 0,17^\circ\text{C}$. Таким образом была получена уникальная клеточная линия CHO-K1-RBD обеспечивающая синтез и секрецию в культуральную среду RBD по своей структуре и физико-химическим свойствам близкого к нативному доменному RBD S-белка SARS-CoV-2. Преимуществом работы является создание клеточной линии именно со стабильной экспрессией RBD. Это позволило обеспечить стабильный и высокий выход целевого белка. Одним из плюсов работы является использование линии перевиваемых клеток яичника китайского хомячка CHO-K1, в качестве исходной линии для создания штамма-продуцента CHO-K1-RBD, что позволяет получать рекомбинантный белок с минимальным риском изменения структуры белка и

посттрансляционных модификаций. В результате изучения антигенных и иммуногенных свойств, показано, что рекомбинантный RBD специфически взаимодействует с человеческим рецептором ACE2 ($KD = 58.2 \pm 1.3$ нМ), сывороточными IgG реконвалесцентов COVID-19, и рядом нейтрализующих моноклональных антител. Эти результаты согласуются с данными для RBD полученного в клетках человека или насекомых, что дополнительно указывает на адекватность использованной клеточной линии для экспрессии RBD, а также на то, что рекомбинантный RBD сохраняет профиль эпитопов соответствующих природному варианту и даже при вычленении его из структуры тримера S-белка, он сохраняет антигенные свойства.

Особый интерес представляют исследования иммуногенных свойств рекомбинантного RBD и влияния адъювантов на эти свойства. Прежде всего это связано с возможностью использования RBD в качестве компонента вакцин для профилактики COVID-19. Для оценки иммуногенности RBD были использованы четыре модели животных (сирийские хомячки, мыши линии BALB/c, хорьки и кролики породы Шиншилла). У всех животных при иммунизации дозой 50 мкг RBD с гидроокисью алюминия формировался специфический гуморальный иммунный ответ, однако, одна из самых популярных животных моделей (сирийские хомячки) оказались наименее восприимчивы к иммунизации рекомбинантным RBD, что указывает на необходимость с осторожностью использовать данную модель и, выбирать оптимальную, при оценке защитной эффективности вакцин на основе RBD. Кроме этого было исследовано влияние адъювантов различной природы на иммуногенные свойства рекомбинантного RBD, а также разработан конъюгат RBD с полиглобулином, спермидином и дсРНК дрожжей в качестве адъюванта, который способен индуцировать специфический гуморальный (на уровне стандартных адъювантов – гидроокись алюминия, неполный адъювант Фрейнда) и Т-клеточный иммунный ответ у мышей линии BALB/c.

Результаты исследования подкреплены данными представленными в виде рисунков и таблиц, позволяющими получить наглядное представление о проведенном исследовании.

В главе «Обсуждение результатов» рассматриваются полученные собственные результаты в сравнении с результатами ранее опубликованных работ. В заключении подводятся итоги исследования, автор обобщает результаты исследования и отмечает их теоретическую и практическую значимость.

Автореферат диссертации оформлен в соответствии с общепринятыми требованиями, соответствует ее содержанию и дает представление о проделанной работе и результатах.

Апробация результатов. Основные результаты работы детально отражены в 14 публикациях, из которых 4 статьи в рецензируемых зарубежных журналах, 1 статья в рецензируемом отечественном журнале и 9 публикаций в сборниках тезисов докладов на российских и международных научных конференциях. Получен 1 патент РФ № 2752858 на изобретение, что подчеркивает практическую ценность данной работы.

Вопросы и замечания к диссертационной работе.

- 1) Для получения рекомбинантного RBD автором была создана плазида, кодирующая фрагмент S-белка а.о. 308V-541F к которому с N-конца добавлен сигнальный пептид S-белка, а с C-конца метка 10×his. В аналогичных исследованиях, описанных в литературе как правило используется фрагмент а.о. 319R-541F. В диссертации следовало бы описать для чего в структуру рекомбинантного белка был включен сигнальный пептид и междоменный фрагмент 308V-319R, какие это дает преимущества и может ли эта последовательность быть связана с наблюдаемым автором образованием димеров и тримеров RBD.
- 2) Автором были обнаружены различия в молекулярной массе RBD в клеточном лизате и образцах культуральной среды (рисунок 9), которые автор объясняет гликозилированием при выходе RBD из клеток. Что известно о молекулярных механизмах данного процесса и описан ли в литературе подобный эффект для RBD полученных на основе других систем?

Данные замечания не носят принципиального характера и не влияют на общее положительное впечатление о диссертационной работе.

Заключение. Диссертационная работа Меркульевой Юлии Александровны на тему: «Свойства рекомбинантного рецептор-связывающего домена S-белка SARS-COV-2, полученного в клетках CHO-K1», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук, является законченной, самостоятельной, научно-квалификационной работой и соответствует паспорту специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Учитывая актуальность, новизну, научную и практическую значимость результатов диссертационной работы Меркульевой Ю.А. считаю, что диссертация и автореферат соответствуют требованиям п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842, в редакции Постановлений Правительства Российской Федерации от 30.07.2014 № 723, от 21.04.2016 №335, от 02.08.2016 №748, от 29.05.2017 №650, от 28.08.2017 №1024, от 01.10.2018 №1168, от 20.03.2021 №426, от 11.09.2021 №1539, предъявляемым к

диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а её автор, Меркульева Юлия Александровна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология.

Официальный оппонент:
кандидат биологических наук (специальность генетика),
заведующий лабораторией структурно-функциональной
организации генома
ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный
государственный университет»

Орищенко Константин Евгеньевич,

630090, Новосибирск, Россия, пр.ак.Лаврентьева,10
Телефон: +7 383/363-49-03*1308
E-mail: OrishchenkoKE@icg.sbras.ru

Подпись Орищенко К.Е. заверяю
Специалист Управления кадров НГУ
Меркульева Ю.А.
« 30 » 01

