

СТАНОВИЩЕ

от доц. д-р Кирил Михайлов Мишев (ИФРГ-БАН)

за дисертационния труд „Изучаване динамиката на процеси в живи клетки чрез съвременни микроскопски подходи“,

представен от **Александър Сергеев Атемин** (Лаборатория по геномна стабилност, ИМБ-БАН) за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“

Дисертационният труд на тема „Изучаване динамиката на процеси в живи клетки чрез съвременни микроскопски подходи“, представен от Александър Сергеев Атемин за придобиване на образователната и научна степен „Доктор“, е изработен в Лабораторията по геномна стабилност към ИМБ-БАН първоначално под ръководството на доц. Марина Неделчева-Велева, а впоследствие съвместно с доц. д-р Стойно Стойнов като научен консултант на докторанта.

Работата на Александър Атемин е посветена на разработване и прилагане на иновативни подходи за изучаване на силно динамични процеси на клетъчно ниво, като се използват преимуществата на конфокалната лазерна микроскопия за визуализация *in vivo* в реално време. Комбинирането на методи от областта на молекулярната, клетъчната и химичната биология (клонирание и трансфекция за генериране на флуоресцентни маркерни линии, съвременна светлинна микроскопия, третиране с химични инхибитори) и на програмирането (разработване на програмни алгоритми за анализ на микроскопски данни) е позволило да бъде получена нова информация за ендомембранния трафик на вируси, както и времето и пространствено разпределение на определени ядрени белтъци в човешки клетки. По-конкретно, дисертантът насочва своята работа в две направления - изследване на (1) механизмите на интернализация на SARS-CoV-2 в клетки-гостоприемници и (2) динамиката на натрупване на ключови белтъчни регулатори на ДНК репликацията в хода на клетъчния цикъл. Получените резултати имат значителен приносен характер, тъй като допринасят не само за по-доброто разбиране на фундаментални клетъчни процеси, но и за потенциалното разработване на иновативни бъдещи стратегии за лечение на заболявания, свързани със заразяване с вируса SARS-CoV-2 и с неправилно протичане на репликацията и поправката на ДНК.

За осъществяване на работата по първото направление дисертантът участва в научно сътрудничество с партньорска лаборатория от Университета на Юта, която е разработила протокол за получаване, пречистване и флуоресцентно белязане на SARS-CoV-2 вирусоподобни частици с максимално запазена конформация и стехиометрия на структурните SARS-CoV-2 белтъци, но с компрометирана репликация. С тези частици А. Атемин провежда детайлни микроскопски експерименти, които целят изясняване на последователността, продължителността и координирането на отделните стъпки от процеса на навлизане на вируса в клетката-гостоприемник. След успешно валидиране на запазената функционалност на вирусоподобните частици, дисертантът проследява техните траектории, скорости на движение и сила на флуоресцентния сигнал с прилагането на програмен алгоритъм, създаден в Лабораторията по геномна стабилност на ИМБ-БАН специално за целите на това изследване. А. Атемин има съществен личен принос в тестването и усъвършенстването на софтуерното приложение. По този начин се установява, че при свързването им на клетъчната повърхност частиците забавят своето движение, а при интернализацията им в цитоплазмата скоростта се увеличава. Това навлизане се осъществява чрез динамин-зависима ендцитоза, като колокализацията на частиците с динаминови фокуси и тяхното ускоряване (интернализация) са близко разположени събития във времето, а подтискането на динаминовата

функция предотвратява навлизането на частиците във вътрешността на клетката. С помощта на флуоресцентно белязан Rab5a белтъчен маркер за ранни ендозоми е показана липса на колокализация с интернализираните вирусopodobни частици, които обаче се откриват в кисели компартменти, белязани с LysoTracker. Дисертантът използва и двойно белязани частици с белтъчен рН сензор, чрез който установява, че в повечето случаи частиците попадат в кисели компартменти преди да се дезинтегрират, като ацидификацията и увеличаването на скоростта на движение са в близък интервал от време. При това е показано, че нивата на ACE2 рецептора и TMPRSS2 протеазата в клетката-гостоприемник повлияват броя интернализирани частици. Друго важно наблюдение е, че скоростта и ефикасността на интернализацията на вирусopodobните частици могат съществено да варират в зависимост от типа прицелни клетки. Частици, в състава на които е мутирано мястото на сръзване с протеазата Furin в секвенцията на S белтъка, се ендоцитират по сходен начин с частиците без мутация, което показва, че това сръзване няма ефект върху навлизането в клетката. Мутациите във варианта Omicron също не оказват влияние върху динамиката на интернализация. Дисертантът анализира и кинетиката на освобождаване на нуклеокапсида спрямо отделните етапи на интернализация. С помощта на вирусopodobни частици с флуоресцентно белязан N белтък е установено, че отделянето на нуклеокапсида и понижаването на рН на ендозомалния компартмент с интернализираната частица се осъществяват по едно и също време. Като цяло, проведените по време на изработване на дисертационния труд прецизни измервания разкриват за първи път динамиката и част от регулаторните механизми на ендоцитозата на SARS-CoV-2 в клетката-гостоприемник. Получената информация от изследванията на А. Атемин създава предпоставки за развитието на нови антивирусни терапии, основани на подтискане на интернализацията на вирусните частици в прицелните клетки.

За работата по второто научно направление от дисертационния труд А. Атемин приоритизира изучаването на динамиката на натрупване и разпределение на пет белтъчни регулатора на репликацията на ДНК в човешки клетъчни линии в рамките на клетъчния цикъл. За тези белтъци е известно, че участват в лицензирането и активирането на началата на репликация, но също и в контрола на репликацията (RIF1, Claspin) и в процеса на репарация на увредена ДНК (PCNA, RIF1). А. Атемин генерира двойни флуоресцентни маркерни линии и с тях провежда измервания и нормализация на данните, получени от няколко единични клетки за установяване на средната продължителност на целия клетъчен цикъл и на отделните фази от него. Количественият анализ на флуоресцентния сигнал и размера на фокусите на PCNA след прилагане на филтър за модулиране на контраста на микроскопските изображения позволява на дисертанта ясно да разграничи три подфази на S фазата. При детектирането на изучаваните белтъчни регулатори на репликацията на ДНК на фона на флуоресценцията на PCNA-mCherry се установява, че RIF1 и MCM6 са с максимум на натрупване в ранна G1 фаза, последван от постепенен спад. ORC1 е с най-високи нива през ранната S фаза, а Claspin се характеризира с максимално съдържание през средна и късна S фаза. Регистрираната динамика в натрупването и локализацията на изследваните белтъци в рамките на ядрото корелира с известните към момента функции на тези регулатори в контекста на процесите в хода на клетъчния цикъл.

Съществен принос на дисертанта е участието му в създаването на две бази от данни със свободен достъп, които систематизират и визуализират информацията, генерирана в хода на това и предходни изследвания на Лабораторията по геномна стабилност.

Литературният обзор и списъкът с използвана литература (общо 247 литературни източника) показват отличното познаване от дисертанта на съществуващите до момента изследвания в областта на механизмите на репликация на ДНК, както и в една нововъзникнала област с огромна по обем научна информация, свързана със SARS-CoV-2 и причиненото от вируса заболяване COVID-19. А. Атемин успява да обобщи в синтезиран вид публикуваните към момента данни за структурата и жизнения цикъл на вируса. Без да омаловажавам информационната им стойност, считам, че стратегиите за лечение на COVID-19 са описани прекалено подробно, тъй като

нямат пряко отношение към експерименталната работа на дисертанта. Направен е и преглед на първоначалните етапи от репликацията и ключовите белтъци, които участват в лицензиране на началата на репликацията и инициацията на процеса. За разлика от предходната глава от обзора, тук дисертантът не е илюстрирал съдържанието на текста с фигури, адаптирани от ключови публикации по разглежданата тематика.

Целта и задачите на дисертационния труд са представени кратко и ясно. Описанието на експерименталните методи е изчерпателно и позволява възпроизвеждане на експериментите при необходимост. Съществуват дребни и несъществени неточности, например при описанието на концентрациите на използваните инхибитори и багрила (стр. 43). Важно е да се отбележи, че А. Атемин е успял ясно да разграничи собственото си експериментално участие от това на останалите научни партньори както по отношение на методичната част, така и при описанието на получените резултати.

Разделът „Резултати“ обхваща почти половината от обема на дисертацията без библиографията и съдържа 24 фигури, повечето съставени от няколко панела с данни. Експерименталните резултати и начините за извършване на изчисленията са описани ясно и в логически порядък, като е следвана последователността, зададена в раздела с целите и задачите. Приложените подходи за изследване на трафика на вирусоподобните частици предоставят изчерпателна информация, позволяваща на дисертанта да направи обосновани изводи. Единствено за доказване на движението на частиците по микротубулната мрежа считам за необходимо в бъдеще провеждането на допълнителни експерименти. Предположението, че увеличаването на скоростта на движение на частиците при интернализация в клетката вероятно се дължи на активен транспорт по микротубулите, е направено въз основа на наблюдавана колокализация на флуоресцентните сигнали. Тези данни могат да бъдат подкрепени и с други подходи, например третиране с фотопревключващи се инхибитори на микротубулната динамика, каквито са флостатините.

Разделът „Дискусия“ обхваща 6 страници, като в тази част от дисертацията А. Атемин е успял в кратък и стегнат вид да интерпретира получените от него резултати спрямо съществуващите литературни данни. Относно ендоцитозата на SARS-CoV-2, в обсъждането на резултатите би могло да се отдели внимание и на потенциалното влияние на ACE2 рецептора върху динамиката на интернализация на вируса и освобождаването на нуклеокапсида. Известно е, че след разпознаването и свързването на SARS-CoV-2 с ACE2 с помощта на S белтъка, рецепторът навлиза в клетката заедно с вируса. В отсъствие на лиганд по-голямата част от молекулите на рецептора са подложени на рециклиране (придвижване от плазмената мембрана към ендозоми и обратно) и само малка част се насочва към лизозомите за разграждане като част от търновъра на белтъка. В процеса на рециклиране участват множество регулатори на трафика. За един от тези регулатори (SNX27) вече е установено, че, освен ACE2, потенциално може да разпознава и специфичен мотив в цитоплазмения домен на S белтъка. Свързването на SNX27 с вирусната частица подтилка рециклирането на ACE2 и по този начин намалява нивата на рецептора на клетъчната повърхност. Остава неизвестен етапът, на който става разделянето на SARS-CoV-2 от ACE2 и какво отношение има този процес към навлизането на вирусната частица.

Изводите и приносите в края на дисертацията са ясно формулирани и напълно отразяват представените експериментални резултати. Представеният автореферат коректно резюмира дисертационния труд и публикационната активност на Александър Атемин.

Статиите на дисертанта по темата на дисертацията са общо 3 и са публикувани в международни списания с ранг Q1. В тези статии индивидуалните приноси на А. Атемин са ясно разграничени от тези на останалите съавтори. В две от статиите А. Атемин е първи автор. Представената от дисертанта информация и извършените допълнителни справки демонстрират високата научна активност и качество на научната продукция на А. Атемин. Той е съавтор в още 5 научни публикации извън темата на дисертацията. Забелязаните цитирания на статии с негово

участие до момента са над 115 според Scopus и над 175 според Google Scholar. В рамките на 8-годишен период А. Атемин е взел участие в 11 научни форума в страната и чужбина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ:

Дисертационният труд обобщава по убедителен начин няколкогодишни изследвания на Александър Атемин с фундаментална насоченост. Дисертантът разработва иновативен подход за изучаване на клетъчни процеси с голяма молекулярна динамика, каквито са навлизането на SARS-CoV-2 частици в клетката-гостоприемник и пространственото и времевото разпределение на белтъчни регулатори на репликацията в хода на клетъчния цикъл. Получените резултати имат потенциално отношение към създаването на нови подходи за терапия на социалнозначими заболявания, каквото е COVID-19. Създадените с участието на А. Атемин онлайн-базирани платформи с обработени данни от експерименти с използване на съвременна светлинна микроскопия на живи клетки, представляват ценен ресурс, насочен към други изследователски групи, работещи в същото направление. Достъпът на А. Атемин до високотехнологични платформи в ИМБ му е дал възможност да се изгради като висококвалифициран изследовател в областта на молекулярната и клетъчната биология. Дисертантът се отличава и със сериозна публикационна активност, като високата цитируемост отразява актуалността и голямата значимост на получените резултати. Въз основа на представените ми за становище материали и допълнителните справки считам, че са напълно изпълнени нормативните изисквания и **убедено препоръчвам на уважаемото научно жури да присъди на Александър Сергеев Атемин образователната и научна степен „Доктор“** в професионално направление 4.3. Биологически науки, научна специалност „Молекулярна биология“.

15.11.2024 г.

Изготвил становището:

(Кирил Мишев)