

## 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».

### **Актуальность**

Пандемия COVID-19, развернувшаяся в 2020–2021 годах, оказала значительное влияние на все сферы общественной жизни и стала причиной серьезных социально-экономических последствий. Несмотря на то что чрезвычайная фаза пандемии завершилась, COVID-19 все еще представляет глобальную угрозу для здоровья населения многих стран. Появление вакцин против вируса SARS-CoV-2 существенно улучшило картину распространения инфекции, однако в связи с активной эволюцией вируса эффективность вакцин не является абсолютной. Все большую актуальность представляет поиск новых веществ-ингибиторов SARS-CoV-2, способных облегчить течение инфекции у пациентов. Для достижения этих целей необходима разработка безопасных систем с использованием клеток человека, позволяющих проводить скрининг потенциальных веществ-ингибиторов в лабораторных условиях, а также изучать поведение и свойства отдельных белков коронавируса. Диссертационная работа Соколинской Е.Л. посвящена разработке безопасных клеточных моделей для изучения свойств отдельных белков SARS-CoV-2 с использованием методов флуоресцентной микроскопии, которые могут найти потенциальное применение в качестве платформ для высокопроизводительного скрининга новых или уже существующих вирусных ингибиторов.

### **Научная новизна и значимость**

В работе Соколинской Е.Л. при помощи методов флуоресцентной микроскопии впервые была продемонстрирована тенденция нативного М-белка SARS-CoV-2 к формированию олигомеров в клетках человека. Данные результаты являются значимыми для формирования полной картины функционирования структурного белка М в жизненном цикле вируса, которая на данный момент в научном сообществе до конца не сформирована. Также в рамках данной работы автор разработал первый генетически кодируемый FRET-сенсор для изучения активности протеазы PLpro SARS-CoV-2, который обладает рядом преимуществ по сравнению с ранее опубликованными вариантами биосенсоров. Среди преимуществ стоит отметить ратиометрический ответ сенсора и снижение



фототоксичности наблюдения за счет смещения спектра работы сенсора в красную область. Помимо этого, в рамках данной работы впервые были разработаны транслокационные сенсоры для PLpro. В дальнейшем разработанные биосенсоры могут служить основой для безопасных скрининговых платформ для тестирования потенциальных ингибиторов протеазы PLpro SARS-CoV-2 в лабораторных условиях.

### **Структура диссертации**

Диссертация построена по традиционной схеме и содержит Введение, в котором обоснована актуальность работы и ясно сформулированы цели и задачи исследования, Обзор литературы, Материалы и методы, Результаты и их обсуждение, Заключение, Выводы и Список литературы. Работа изложена на 123 страницах и включает 48 рисунков. Список литературы состоит из 203 ссылок. Материал диссертации изложен подробно и логично, разделы текста взаимосвязаны друг с другом, все выводы подкреплены соответствующими экспериментами.

«Обзор литературы» состоит из трех частей. В первой части автор дает краткие сведения о происхождении и течении пандемии COVID-19, описывает патогенез инфекции и существующие методы терапии, а также подробно рассматривает жизненный цикл SARS-CoV-2, уделяя особое внимание строению и функциям структурных белков и протеаз коронавируса. Вторая часть посвящена генетически кодируемым сенсорам и содержит описание основных классов биосенсоров на основе флуоресцентных белков, подкрепленное примерами их использования из литературных источников. В третьей части литературного обзора автор подробно рассматривает существующие на данный момент генетически кодируемые сенсоры на протеазы. В целом, «Обзор литературы» написан ясно и подробно и дает полное представление о проблемах и задачах в данной области исследования.

Глава «Материалы и методы» подробно описывает все методики, используемые автором для проведения исследований. Автор демонстрирует владение широким набором молекулярно-генетических методов, как традиционных, так и современных, таких как метод модульного клонирования MoClo. Методы работы с культурами эукариотических клеток также представлены полно, включая описание состава сред для ведения клеточных культур, получение стабильных линий клеток, иммуоцитохимию и инфицирование клеток вирусом SARS-CoV-2. В подразделе «Флуоресцентная микроскопия» автор демонстрирует владение методами конфокальной и широкопольной микроскопии, а также последующей обработки полученных изображений.



Раздел «Результаты и обсуждение» состоит из двух частей и содержит основные результаты работы. Первая часть посвящена изучению олигомеризационных свойств М-белка SARS-CoV-2. В ходе экспериментов на клеточной линии HEK293T была обнаружена склонность М-белка к формированию межмембранных олигомеров, которые визуализировались в виде «стопок» мембран ЭПР. Вторая серия экспериментов была проведена на клеточной линии HeLa. В ходе нее в некоторых клетках была обнаружена тенденция М-белка к формированию филаментоподобных структур, что также может быть результатом олигомеризации.

Вторая часть раздела «Результаты и обсуждение» посвящена разработке генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров для изучения активности коронавирусной протеазы PLpro. В первом подразделе автор описывает создание дальнекрасного FRET-сенсора для растворимой протеазы PLpro, в основе которого лежит использование белков mScarlet в качестве донора и mRFP670 в качестве акцептора, разделенных линкером с сайтом узнавания протеазы. В системе с рекомбинантной протеазой полученный FRET-сенсор продемонстрировал увеличение флуоресценции донора в 1,3–1,6 раза, что подтверждает пригодность его использования для некоторых биологических задач. Второй подраздел посвящен созданию трех вариантов биосенсоров на основе принципа транслокации для мембран-ассоциированной PLpro. Для оценки эффективности работы сенсоров автор использовал параметр, представляющий собой отношение флуоресцентного сигнала в ядре к флуоресцентному сигналу в цитоплазме в красном и зеленом каналах. При этом оценивалось изменение этого параметра в контрольных клетках без протеазы и в системе с активной протеазой. Первый вариант биосенсора, PLpro-sensor-TA, локализовался на мембране ЭПР посредством «ТА-якоря», и полученное значение параметра при активации PLpro в клетках увеличивалось примерно в 2 раза. Во втором варианте биосенсора, PLpro-sensor-Plus, «ТА-якорь» был заменен на мембран-ассоциированную часть молекулы белка nsp3, в состав которого входит каталитический домен PLpro. Это позволило создать в экспериментальной системе белковый контекст, максимально приближенный к условиям инфекции. В клетках с активной протеазой значение анализируемого параметра также увеличивалось примерно в 2 раза по сравнению с контрольными клетками. Третий вариант транслокационного биосенсора, PLpro-ERNuc, представлял из себя модернизированный вариант PLpro-sensor-Plus, на С-конец которого был добавлен сигнал ядерной локализации NLS. Это способствовало накоплению зеленого сигнала в ядре вследствие протеолиза и заметному увеличению динамического диапазона сенсора – значение анализируемого параметра в системе с рекомбинантной протеазой увеличивалось примерно в 14 раз по сравнению с контрольными клетками. Далее сенсор PLpro-ERNuc был протестирован в



клеточной модели инфекции SARS-CoV-2. В инфицированных клетках, где разрезание сайта в составе сенсора должно было происходить в результате работы вирусной протеазы, также наблюдалась искомая транслокация зеленого сигнала из сети ЭПР в ядро. При обработке клеток вирусным ингибитором – молнупировиром, изменения локализации флуоресцентного сигнала не происходило, что подтверждает гипотезу о том, что транслокация происходит в результате работы вирусной протеазы.

Диссертационная работа завершается разделами «Заключение» и «Выводы». В «Заключении» автор кратко обобщает основные результаты, делая акцент на их теоретической и практической значимости. Выводы, сделанные на основании полученных результатов, являются четкими и соответствуют поставленным задачам. Автореферат отражает основное содержание диссертации и выносимые на защиту положения.

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

### **Вопросы и замечания**

В разделе «Результаты и обсуждение» автором была описана способность М-белка SARS-CoV-2 формировать «филаментоподобные структуры» при экспрессии в линии HeLa. В ходе анализа данного феномена автором было установлено, что филаменты представляют из себя жесткие структуры, длина которых составляет порядка 10 мкм. Было бы интересно провести более детальное исследование данных структур при помощи методов микроскопии с более высокой разрешающей способностью (например, трансмиссионной электронной микроскопии), а также посмотреть оценить условия формирования данных структур при коэкспрессии с другими структурными белками SARS-CoV-2.

### **Заключение**

Диссертационная работа Соколинской Елены Леонидовны «Визуализация клеток человека» 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.



сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Заместитель директора по научной работе  
и инновационному развитию  
ФГБУ «Национальный медицинский  
исследовательский центр  
фтизиопульмонологии и инфекционных  
заболеваний» Минздрава России, д.м.н.

Чуланов Владимир Петрович

«24» ноября 2024 г.

Контактные данные:

тел.: +7 925 748 88 74, e-mail: vladimir@chulanov.ru

Адрес места работы: Федеральное государственное бюджетное учреждение «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 127473, Москва, ул. Достоевского, д. 4, кор. 2.

Тел.: +7 495 631 15 15; e-mail: nmrc@nmrc.ru

Подпись В.П. Чуланова удостоверяю:

Заместитель директора по научной работе  
ФГБУ «НМИЦ ФПИ» Минздрава России  
д.м.н.



Самойлова А.Г.