

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,**  
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической  
химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии  
наук, по диссертации на соискание учёной степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 18.12.2024 № 30

О присуждении **Соколинской Елене Леонидовне** учёной степени кандидата  
биологических наук.

Диссертация «Визуализация локализации и активности индивидуальных белков коронавируса SARS-CoV-2 в культурах клеток человека» по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология» принята к защите 16 октября 2024 г. (протокол заседания № 21) диссертационным советом 24.1.037.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственный научный центр Российской Федерации Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10, и действующим на основании Приказов Минобрнауки России №75/нк от 15.02.2013 г. и №561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Соколинская Елена Леонидовна, 7 октября 1995 года рождения, в 2019 году окончила биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по специальности «Молекулярная биология», в 2023 году окончила аспирантуру Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий» по направлению подготовки 06.06.01 «Биологические науки». В настоящий момент работает в должности научного сотрудника в научном отделе ООО «Хайтест».

Диссертационная работа выполнена в Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий».

Научный руководитель - доктор биологических наук, член-корр. РАН Лукьянов Константин Анатольевич, доцент Школы фармакологии им. Эшелмана Университета Северной Каролины в Чапел Хилле.

Официальные оппоненты:

Савицкий Александр Павлович, доктор химических наук, профессор, заведующий Лабораторией физической биохимии Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, и Чуланов Владимир Петрович, доктор медицинских наук, заместитель директора по научной работе и инновационному развитию Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский

исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава РФ дали *положительные* отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук (ФГБУН ИБГ РАН), Москва, в своем *положительном* отзыве, подписанном заведующим Лабораторией молекулярной генетики внутриклеточного транспорта ФГБУН ИБГ РАН, доктором биологических наук Соболевым Александром Сергеевичем и утвержденном директором ФГБУН ИБГ РАН, академиком РАН, доктором биологических наук Георгиевым Павлом Георгиевичем, указала, что диссертация Соколинской Елены Леонидовны «Визуализация локализации и активности индивидуальных белков коронавируса SARS-CoV-2 в культурах клеток человека» соответствует всем критериям (в том числе п. 9), установленным «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология».

Соискатель имеет 3 опубликованные работы по теме диссертации объемом 3 печатных листа в рецензируемых научных изданиях из списка, рекомендованного Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций (входят в базы Scopus и Web of Science). В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем учёной степени работах. Научные работы по теме, в которые Соколинская Е.Л. внесла основной либо существенный вклад, включают:

1. E. L. Sokolinskaya, L. V. Putlyaeva, V. S. Polinovskaya, K. A. Lukyanov. Genetically Encoded Fluorescent Sensors for SARS-CoV-2 Papain-like Protease PLpro // International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(14):7826.
2. E. L. Sokolinskaya, L. V. Putlyaeva, A. A. Gorshkova, K. A. Lukyanov. Intermembrane oligomerization of SARS-CoV-2 M-protein: possible role in viral budding. // Bulletin of Russian State Medical University. 2022. № 3. P. 38–41.
3. E. L. Sokolinskaya, O. N. Ivanova, I. T. Fedyakina, A. V. Ivanov, K. A. Lukyanov. Natural-Target-Mimicking Translocation-Based Fluorescent Sensor for Detection of SARS-CoV-2 PLpro Protease Activity and Virus Infection in Living Cells // International Journal of Molecular Sciences, 2024, 25(12): 6635.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н. **Савицкого Александра Павловича**. Отзыв *положительный*, содержит следующие замечания и вопросы:

- 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 сокращения с расшифровкой, таких как, например, mAvicFP1-ER и OSER-структуры, смысл которых без чтения текста диссертации не понятен.

Отзыв официального оппонента д.м.н. **Чуланова Владимира Петровича**. Отзыв *положительный*, содержит следующие замечания и вопросы:

1) 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 условия формирования данных структур при коэкспрессии с другими структурными белками SARS-CoV-2.

Отзыв **ведущей организации**. Отзыв *положительный*, содержит следующие 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 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.

Отзыв **на автореферат** д.х.н., заведующей Отдела химии нуклеиновых кислот НИИ Физико-химической биологии им. А.Н.Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова Готтих Марины Борисовны. Отзыв **положительный**, не содержит замечаний.

Отзыв **на автореферат** к.б.н., заведующего Лаборатории генетических технологий Первого МГМУ им. И.М. Сеченова Костюшева Дмитрия Сергеевича. Отзыв **положительный**, не содержит замечаний.

Выбор официальных оппонентов и ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике работы: генетически кодируемые флуоресцентные сенсоры, FRET-сенсоры, флуоресцентная микроскопия, генотерапия и специфическая диагностика инфекционных заболеваний, внутриклеточная доставка лекарств, использование нанотранспортеров для внутриклеточной деградции N-белка SARS-CoV-2, что подтверждается сериями их публикаций в ведущих российских и международных журналах. Оппоненты и представители ведущей организации обладают высокой квалификацией и большим опытом исследовательской и экспертной работы, который позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, а также ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые была наглядно продемонстрирована тенденция нативного М-белка SARS-CoV-2 к олигомеризации при экспрессии в клетках человека. Данный феномен был выявлен автором при помощи метода флуоресцентной микроскопии. Также в ходе данной работы были разработаны первый генетически кодируемый FRET-сенсор для изучения активности протеазы PLpro SARS-CoV-2, а также три генетически кодируемых сенсора для изучения активности мембран-ассоциированной PLpro на основе принципа транслокации. Все биосенсоры продемонстрировали эффективную работу при тестировании в клетках млекопитающих, а наиболее успешный из них был дополнительно протестирован в клеточной модели инфекции.

**Теоретическая значимость** исследования обоснована тем, что результаты проведенной работы вносят вклад в формирование картины функционирования структурного белка М в жизненном цикле SARS-CoV-2, которая на данный момент в научном сообществе до конца не сформирована. Автором была выдвинута гипотеза о том, что наблюдаемая олигомеризация может служить движущей силой для сближения и слияния мембран при отшнуровывании вирусных частиц SARS-CoV-2. Используемая в работе модель для экспрессии М-белка в клетках млекопитающих также может служить

удобной платформой для дальнейшего изучения феномена при помощи различных методов флуоресцентной микроскопии.

**Значение** полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что разработанные биосенсоры могут служить основой для безопасных скрининговых платформ для тестирования потенциальных ингибиторов протеазы PLpro SARS-CoV-2 в лабораторных условиях. Кроме того, используемая автором модельная система для изучения свойств М-белка при помощи флуоресцентной микроскопии потенциально может быть использована в качестве основы для скрининга противовирусных веществ, ингибирующих подобную олигомеризацию.

**Достоверность результатов** исследований сомнений не вызывает. Исследования проводились с использованием современных научных методов и подходов; экспериментальные данные были получены с использованием сертифицированного оборудования, воспроизводимость результатов неоднократно продемонстрирована и подкреплена статистической обработкой данных. Материал, представленный в работе, опубликован в российских и зарубежных рецензируемых научных журналах.

**Личный вклад** соискателя состоит в непосредственном участии в планировании и проведении научных экспериментов, литературном поиске, сборе данных, разработке новых экспериментальных методик и методик анализа данных, интерпретации полученных результатов, участии в апробации результатов исследования на российских конференциях, подготовке публикаций. Все экспериментальные и теоретические исследования по теме диссертации проведены лично соискателем, за исключением эксперимента с использованием вируса SARS-CoV-2, который был осуществлен Федякиной И.Т. (Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи), Ивановой О.Н. и Ивановым А.В. (Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук).

Диссертационный совет 24.1.037.01 заключил, что диссертационная работа Соколинской Елены Леонидовны является законченной научно-квалификационной работой, в которой решена научно-практическая задача разработки генетически кодируемых сенсоров на основе двух различных принципов детекции сигнала для изучения активности папаин-подобной протеазы PLpro SARS-CoV-2, а также впервые визуализированы некоторые особенности функционирования М-белка SARS-CoV-2 в клетках человека, что вносит существенный вклад в развитие исследований в области молекулярной биологии, вирусологии и эпидемиологии.

Работа написана автором самостоятельно, содержит новые и актуальные научные результаты, а по своему содержанию соответствует специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Таким образом диссертационная работа Соколинской Елены Леонидовны «Визуализация локализации и активности индивидуальных белков коронавируса SARS-CoV-2 в культурах клеток человека», представленная на соискание учёной степени

кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология, соответствует всем требованиям, предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней», утвержденном Постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. No 842 с изменениями Постановления Правительства Российской Федерации от 21.04.2016 г. No 335; 02.08.2016 г. No 748; 29.05.2017 г. No 650; 20.03.2021 г. No 426; 11.09.2021 г. No 1539; 26.09.2022 г. No1690; 26.01.2023 г. № 101; 25.01.2024 № 62).

В ходе защиты диссертации были заданы следующие вопросы:

- 1) Как вы считаете, пути диффузии М-белка при инфицировании клетки вирусом SARS-CoV-2 и при экспрессии М-белка в вашей клеточной системе будут аналогичными?
- 2) Проводилась ли электронная микроскопия олигомерных форм М-белка?
- 3) Сколько копий М-белка находится в вирионе клетки и сколько копий вирионов продуцирует клетка при заражении?
- 4) Какое соотношение вируса к клеткам было при тестировании транслокационного биосенсора на живом вирусе и что представляет из себя этот вирус – тот, что был в человеческой популяции или некий модифицированный, более безопасный вирус? Насколько ваш сенсор можно использовать практически, в клиниках?

Соискатель Соколинская Е.Л. ответила на задаваемые в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

- 1) Естественно, при проведении гиперэкспрессии в клеточной системе не стоит ожидать, что поведение белка будет аналогично таковому при заражении вирусом. Мы не можем утверждать, что именно такие процессы происходят при заражении вирусом. Но некоторые особенности поведения белка при этом сохраняются. В том числе олигомеризация белка, которую мы видим, вполне может происходить внутри вируса. Кроме того, в литературе было показано, что М-белок способен формировать олигомеры более высокого порядка.
- 2) Электронная микроскопия проводилась для полноразмерного вириона. Но подобных филаментов обнаружено не было. Но я напоминаю, что в нашей клеточной модели имеет место гиперэкспрессия белка.
- 3) М-белок составляет примерно 90% оболочки вириона, порядка 1000-1100 молекул. Количество вирионов, которые может произвести одна клетка варьирует для типа клеток.
- 4) В данном эксперименте был использован оригинальный штамм, не модифицированный. Применение данной системы для широкомасштабного скрининга, естественно, требует определенных модификаций. Но нам было интересно сделать такую систему, которая в лабораторных условиях позволяет проводить какие-то скрининги – на самом деле здесь необходим только флуоресцентный микроскоп, и, если у вас есть какие-то химические агенты, вы уже можете наглядно проследить их активность. Поэтому наш инструмент пригоден для проведения исследований в лабораторных условиях, где нет возможности работы с функциональным вирусом.



На заседании 18 декабря 2024 г. диссертационный совет постановил: за решение научной задачи по разработке методов изучения белков SARS-CoV-2 с использованием флуоресцентной микроскопии безопасных модельных клеточных систем, имеющей важное значение для исследований в области молекулярной биологии, присудить **Соколинской Елене Леонидовне** ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 8 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации 1.5.3 - Молекулярная биология, участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 21, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель  
диссертационного совета



академик РАН Мирошников А.И.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

18 декабря 2024 г.