

**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Государственный научный центр Российской Федерации
ИНСТИТУТ БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук**

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета 24.1.037.01 при ИБХ РАН 18 декабря
2024 года

**Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук
Соколинской Елены Леонидовны**

**по теме: Визуализация локализации и активности индивидуальных
белков коронавируса SARS-CoV-2 в культурах клеток человека**

Специальность 1.5.3 – “Молекулярная биология”

Москва – 2024

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Уважаемые коллеги, начинаем заседание диссертационного совета. Сегодня у нас защита диссертации Елены Леонидовны Соколинской «Визуализация локализации и активности индивидуальных белков коронавируса SARS-CoV-2 в культурах клеток человека» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «Молекулярная биология». Научный руководитель: доктор биологических наук Лукьянов Константин Анатольевич. Официальные оппоненты: Александр Павлович Савицкий, доктор химических наук, заведующий Лабораторией физической биохимии ФИЦ «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. И Чуланов Владимир Петрович, доктор медицинских наук, профессор кафедры инфекционных болезней Сеченовского Университета, отсутствует, в командировке. И ведущая организация: Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников: Материалы личного дела. Соколинская Елена Леонидовна, гражданка Российской Федерации. Окончила МГУ в 2017 году по направлению подготовки 06.03.01 «Биология». С 2018 по 2023 – инженер Лаборатории генетически кодируемых молекулярных инструментов, с 2023 по 2024 – инженер Лаборатории химии гетероциклических соединений нашего института. С ноября 2024 года по настоящее время – научный сотрудник в научном отделе ООО «Хайтест». С 2019 по 2023 – аспирант Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий». Кандидатский экзамен по специальности «Молекулярная биология» – оценка «отлично». Работа выполнена в Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий». Научный руководитель – профессор, доктор биологических наук Лукьянов Константин Анатольевич. По теме диссертации опубликовано 3 статьи в рецензируемых научных журналах. Объявление о защите и автореферат диссертации на сайте ВАК размещены вовремя, а именно 17 октября 2024 года, и все необходимые документы в «деле» имеются.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо. Елена Леонидовна, прошу Вас.

Соискатель Е.Л. Соколинская: *(Излагает основные положения диссертационной работы)*

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо. Вопросы. Да, пожалуйста.

Д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов: Спасибо. Вопрос такой, по первой части, что касается М-белка. Я может быть не очень понял дебютную идею. То есть Вы в названии выносите

«Визуализация локализации», в том числе, «М-белка в клетке при инфицировании». А с другой стороны, Вы заставляете клетку нарабатывать, синтезировать этот белок и смотрите, где он в клетке локализуется. Какая связь между этими двумя подходами, целями? Одно дело, когда М-белок попадает с вирусом в клетку, он формирует оболочку вирусную, мембрана разрушается, М-белок куда-то диффундирует. А другое дело, когда он экспрессируется, нарабатывается в клетке, и где-то там тоже локализуется. Вы считаете, что пути его диффузии будут аналогичными?

Соискатель Е.Л. Соколинская: Естественно, при проведении гиперэкспрессии в клеточной системе, не стоит ожидать, что поведение белка будет аналогично таковому при заражении вирусом. Конечно, мы не можем утверждать, что именно эти процессы происходят при заражении клетки, но некоторые свойства белка, его поведения, сохраняются, в том числе олигомеризация, которую мы наглядно видим. Она вполне может иметь место в процессе инфекции. Кроме того, были проведены исследования, в ходе которых была разрешена структура белка, и было показано, что димеры М-белка способны формировать олигомеры более высокого порядка: тетрамеры или гексамеры. Соответственно, олигомеризация имеет место и, вполне возможно, что данное свойство и возможность его наглядного представления в клеточной системе все-таки несет какую-то ценность.

Д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов: Ну, какую ценность? Честно говоря, есть серьезные сомнения, может быть, я просто недостаточно увидел аргументов. Одно дело – М-белок, который формирует оболочку вируса, это интегральный мембранный белок, который в виде димера присутствует в оболочке и формирует оболочку вируса. После слияния клетки он, по-видимому, в каком-то виде будет и с мембраной клетки взаимодействовать, оставаясь в ней, потом переходя в эндоплазматический ретикулум и так далее, у него своя судьба. У М-белка, который нарабатывается в клетке без вируса, без слияния мембран и так далее – возможно, совсем другая судьба. То, что белок способен к олигомеризации – есть структура, и интерфейс олигомеризации известен. Понятно, что белок склонен олигомеризоваться, формировать димеры, ну и дальше тетрамеры, гексамеры и так далее. Но из ваших данных такие тонкие структурные вещи, на мой взгляд, не видны.

Соискатель Е.Л. Соколинская: Да, действительно, тонкие структурные вещи можно разглядеть только при помощи других методов микроскопии, возможно, электронной, например.

Д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов: Ну, это кто-нибудь делал?

Соискатель Е.Л. Соколинская: Электронную микроскопию проводили для полноразмерного вириона, но подобных филаментов обнаружено не было. Но я напоминаю, что здесь идет гиперэкспрессия отдельного белка в клеточной системе. По поводу поведения белка, при заражении вирусом он не имеет взаимодействия с мембраной, так как при заражении вирус выпускает свою РНК, и в клетку попадает только его генетический материал. И, соответственно, М-белок, который формирует будущую оболочку, он производится при помощи ресурсов клетки.

Д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов: Сейчас, подождите, это интересный момент. М-белок формирует мембрану вируса, и происходит слияние мембран на первом этапе. То есть мембраны, их содержимое, грубо говоря, перемешивается. Почему белок не может находиться в мембране клетки-хозяина?

Соискатель Е.Л. Соколинская: Может находиться. Но белок, входящий в состав новых вирионов, скорее всего нарабатывается в ходе жизненного цикла вируса уже под действием клеточной машинерии. Мы в целом проводили изучение локализации белка методом флуоресцентной микроскопии и обнаружили два интересных феномена, которые, очевидно, свидетельствуют об олигомеризации. В одном случае это очень напоминает OSER-структуры, что говорит об олигомеризации в мембранах ЭПР, во втором случае, это структуры довольно крупные, в виде стержней, что в клетках встречается довольно редко. И мы подумали, что это довольно интересная система, и если в дальнейшем будет доказана важность олигомеризации для вируса (естественно, необходимы еще какие-то дальнейшие исследования), то такую систему может быть даже удобно использовать для тестирования каких-то ингибиторов такой олигомеризации.

Д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов: Ну, понятно. Небольшой комментарий: то, что М-белок олигомеризуется – это экспериментальный факт, это хорошо изученный процесс. То есть я не очень понял, в чем здесь новизна Ваших выводов о способности М-белка к олигомеризации.

Соискатель Е.Л. Соколинская: Ну, визуально она в таком виде не была показана. Общепринятый консенсус – то, что М-белок функционирует в виде димера, но исследований по олигомерам более высокого порядка не так много.

Д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов: Спасибо.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо. Еще вопросы.

Д.х.н. В.А. Коршун: Скажите, пожалуйста, сколько копий М-белка находится в вирионе, примерно. И сколько копий вирионов именно продуцирует клетка при заражении.

Соискатель Е.Л. Соколинская: М-белок составляет примерно 90% вириона, то есть, в целом, вирусная оболочка почти из него и состоит.

Д.х.н. В.А. Коршун: Ну, сколько примерно штук?

Соискатель Е.Л. Соколинская: Насколько я помню, порядка 1000-1100 штук, то есть довольно много. При этом число молекул Е-белка измеряется в штуках на один вирион, число молекул S – порядка 15 штук.

Д.х.н. В.А. Коршун: А вирионов сколько зараженная клетка продуцирует?

Соискатель Е.Л. Соколинская: Это вопрос довольно сложный, наверно мне стоит уточнить ответ в литературе. Количество вирионов, которое может произвести одна клетка, сейчас не скажу. Я даже не уверена, что кто-то это смотрел. Возможно, оно еще может варьировать для типа клеток.

Д.х.н. В.А. Коршун: Ну, понятно.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Еще вопросы. Пожалуйста.

К.х.н. А.А. Пахомов: Вы сделали довольно оригинальную систему детекции вируса. Сколько примерно было соотношение вируса к клеткам в последних экспериментах, когда вы тестировали с вирусом? И сам вирус – это был живой вирус, то есть вирус, который у нас в популяции, или это был генетически-модифицированный вирус, который более безопасный? Ну и какой примерно лимит детекции протеазы ваш сенсор показывает, насколько вообще он соотносится с жизнью, насколько его можно использовать практически, в клиниках.

Соискатель Е.Л. Соколинская: Благодарю за вопрос. Данный эксперимент был проведен нашими коллабораторами, Александром Ивановым и Ольгой Ивановой совместно институтом Гамалеи, потому что применение функционального вируса, естественно, ограничено – то есть мы в рамках своей лаборатории не имеем права работать с живым вирусом. Соответственно, здесь был использован штамм, полного названия которого я сейчас сказать не смогу, к сожалению, но оно отражено в «Материалах и методах» диссертационной работы. Но это был оригинальный штамм, не модифицированный, как раз один из первых, который попал в общий доступ для использования, он был из института Гамалеи. Если я не ошибаюсь, то, возможно, даже из Китая. То есть это действительно оригинальный вирус. Что касается вопроса по актуальности применения – действительно, применение системы для широкомасштабного скрининга ингибиторов, естественно, требует некой модификации. Но нам было интересно сделать систему, которая в лабораторных условиях позволяет проводить какие-то скрининги. То есть на самом деле здесь необходим, в целом, только флуоресцентный микроскоп. И если у Вас есть какие-то химические агенты, Вы уже

можете наглядно проследить их активность. Ну и до применения в клинике подобных генетических инструментов – это, конечно, процесс довольно долгий, занимающий довольно много времени для адаптирования. Поэтому наш инструмент скорее пригоден для исследования в лабораторных условиях, где нет возможности работы с функциональным вирусом.

К.х.н. А.А. Пахомов: Ну а соотношение вируса к клеткам сколько у вас было?

Соискатель Е.Л. Соколинская: Там есть такой параметр как «multiplicity of infection», если я не ошибаюсь, «МОІ» сокращенно. Разрешите, я уточню, так как эксперимент проводился не лично мной, до конца деталей не могу сказать.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Еще вопросы? Спасибо. Теперь у нас следующее – это отзыв научного руководителя. Научный руководитель у нас далеко. Но у нас есть письменный его отзыв.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников: А сейчас может он подключится?

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Ну, думаю, что вряд ли.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников: *(Зачитывает отзыв научного руководителя)*. Научным руководителем у нас является Константин Анатольевич Лукьянов. Все мы его знаем. И вот он пишет, что Соколинская проводила научные исследования на базе моей лаборатории, начиная с 2018 года. Выпускница МГУ. За время работы освоила широкий спектр методов молекулярной и клеточной биологии, включая клонирование целевых фрагментов ДНК, гетерологическую экспрессию в бактериальных клетках, ведение и трансфекцию культур эукариотических клеток, получение лентивирусов и лентивирусную трансдукцию, широкопольную флуоресцентную и конфокальную микроскопию, металл-аффинную хроматографию, иммуоцитохимию. Елена Леонидовна является высококвалифицированным специалистом, обладает высокой работоспособностью, стрессоустойчивостью и упорством в преодолении трудностей, с которыми неизбежно сталкивается любой исследователь. Елена Леонидовна является первым автором трех статей. В целом, у меня нет сомнений, что Елена Леонидовна является вполне сложившимся и подготовленным специалистом, полностью соответствующим степени кандидата биологических наук. Ну, Константин Анатольевич Лукьянов.

Так, и сразу перехожу к заключению организации, где выполнялась работа. *(Зачитывает положительное заключение)*. Это Сколковский институт науки и технологий. В период подготовки диссертации с 2019 г. по 2023 г. соискатель Соколинская обучалась в очной аспирантуре Сколковского института науки и технологий по направлению 06.06.01 «Биологические науки». В 2019 г. Соколинская

окончила МГУ, это до того было, значит. Справка с результатами сдачи кандидатских экзаменов выдана в Сколковском институте науки и технологий. И по результатам обсуждения диссертации принято следующее заключение. Тема диссертации является актуальной, ну здесь обоснование актуальности. Цели и задачи сформулированы, мы их слышали сегодня только что в выступлении. Определены были методологии и методы в соответствии с задачами. Ну и перечислены основные результаты диссертации, которые в общем-то совпадают с выводами, которые мы только что видели на экране. Все результаты диссертации получены лично соискателем или при его непосредственном участии. Ну опять же все перечислено. И научная новизна: впервые выявлена тенденция М-белка SARS-CoV-2 к формированию межмембранных олигомеров в клетках человека; впервые выявлена способность М-белка SARS-CoV-2 формировать протяженные прямые филаментообразные структуры в клетках человека; впервые созданы генетически кодируемый флуоресцентный FRET-сенсор дальнекрасного спектра и генетически кодируемые транслокационные биосенсоры для детекции активности протеазы SARS-CoV-2 в живых клетках человека в режиме реального времени. Обоснованность и достоверность: работа выполнена на высоком уровне. Материалы опубликованы в 3 статьях, доложены на конференциях. Диссертационная работа успешно прошла проверку на оригинальность и отсутствие заимствований. И здесь в результате говорится, что диссертация – это законченная научно-квалификационная работа, которая рекомендуется к защите. Ну, соответственно, Заключение принято на заседании программного комитета программы аспирантуры «Науки о жизни» Автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования Сколковский институт науки и технологий. Голосование – единогласное «За». Председатель программного комитета подписал, Михаил Сергеевич Гельфанд, доктор биологических наук, профессор. И, соответственно, утверждено ректором Сколковского Института Науки и Технологий Кулешовым, академик РАН, профессор. Это заключение организации, где выполнялась работа.

Теперь отзыв ведущей организации. *(Зачитывает отзыв ведущей организации)*. Ну, здесь тоже я не буду много повторять: актуальность, научная новизна, об этом сказали. Характеристика: работа построена по стандартной схеме, текст – 123 страницы, 203 ссылки на литературу. Введение, обзор литературы, методы и материалы, обсуждение и результаты – это все части этой работы. Литературный обзор – в целом, дает достаточно хорошее представление о тематике исследования. Материалы и методы содержат всю необходимую информацию о методах, которые были использованы. Результаты и обсуждение: описаны полученные экспериментальные результаты и дана

их интерпретация. Ну и здесь более-менее подробно как раз перечислены эти результаты. Я думаю, что на этом не стоит останавливаться, потому что мы только что это слышали. 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 года 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 странице 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», ну и ссылки, соответственно. Это неточность: цитируемые авторы исследовали не вирус SARS-CoV-2, а другие коронавирусы: SARS-CoV, FCoV и MHV.

Ну и заключение: результаты работы могут быть использованы, целая серия организаций перечислена, где они могут представлять интерес. И далее: по содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической и теоретической значимости полученных результатов, диссертация Соколинской Е.Л. полностью соответствует требованиям (перечислены соответствующие положения), а ее автор, Соколинская Елена Леонидовна, несомненно, заслуживает присуждения степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 Молекулярная биология. Ну, и, соответственно, отзыв был обсужден и одобрен на семинаре лаборатории молекулярной генетики внутриклеточного транспорта Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биологии гена Российской академии наук. Подписал Соболев Александр Сергеевич, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН. И этот отзыв утвержден директором ИБГ РАН, академиком РАН, Георгиевым Павлом Георгиевичем.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо. Елена Леонидовна, давайте отвечать.

Соискатель Е.Л. Соколинская: Если можно, демонстрацию слайдов, буду очень благодарна; у меня есть дополнительный слайд для ответа. По поводу первого вопроса. Было вопрос о возможности заражения клеточной линии гепатомы печени, которая использована была в эксперименте с SARS-CoV-2. Клетки линии Huh7.5 представляют собой человеческую гепатому, и в статье Smirnova и соавторов исследовалась

возможность заражения данной клеточной линии вирусом SARS-CoV-2. В данной статье авторы сделали стабильную линию клеток Huh7.5, экспрессирующую рецептор ACE2, а также стабильную линию, экспрессирующую ACE2 и TMPRSS2. Дело в том, что рецептором при проникновении SARS-CoV-2 в клетку является ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2), а протеаза TMPRSS2 необходима для процессирования S-белка при проникновении SARS-CoV-2. Соответственно, считается, что наличие этих двух белков обеспечивает возможность заражения клетки SARS-CoV-2. Были созданы при помощи лентивирусной трансдукции стабильные линии, экспрессирующие данные белки, и в качестве контроля авторы использовали саму по себе линию Huh7.5, не подвергавшуюся трансдукции. И выяснили, что на самом деле, вот эти контрольные клетки, они, во-первых, проявляют умеренную экспрессию ACE2, то есть он у них по дефолту экспрессируется на умеренном уровне, и этого уровня достаточно для эффективной репликации вируса и заражения. То есть эффективность заражения клеток линии Huh7.5, использованных в данной работе, и стабильной линии Huh7.5, гиперэкспрессирующих рецептор ACE2 и протеазу TMPRSS2, в целом, сопоставима. Поэтому данная клеточная линия эффективно заражается вирусом и может быть использована для данного эксперимента. Ну и также были более ранние исследования, где было показано, что РНК коронавируса была обнаружена в образцах печени пациентов, умерших от COVID-19. Ну и также было показано в 2022 году, что рецептор ACE2 экспрессируется в гепатоцитах. По поводу второго замечания, я с замечанием полностью согласна. Действительно, в литературном обзоре была допущена опечатка, и в упомянутой статье авторы исследовали SARS-CoV-1, FCoV, это кошачий альфакоронавирус, и вирус MHV, мышинный гепатит, который тоже относится к роду бетакоронавирусов.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников: В диссертационный совет поступили два *отзыва на автореферат*. Отзывы полностью положительные. Я просто прочитаю, откуда. Значит, во-первых, первый отзыв подписан зав.отделом химии нуклеиновых кислот НИИ физ-хим биологии имени Белозерского, МГУ, доктор химических наук по специальности биоорганическая химия, профессор Марина Борисовна Готтих подписала. И, соответственно, второй отзыв на автореферат - это лаборатория генетических технологий в создании лекарственных средств, первый МГМУ имени Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), подписал Костюшев Дмитрий Сергеевич, зав.лабораторией. Без замечаний.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо. Александр Павлович, пожалуйста.

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий: *(Излагает отзыв. Отзыв положительный).* Уважаемый председатель, уважаемые коллеги, мы заслушали прекрасный доклад диссертанта, в котором достаточно подробно были изложены все экспериментальные особенности. Поэтому я хотел бы чуть-чуть остановиться на тех аспектах, которые не прозвучали так уж явно. Ну, с моей точки зрения, конечно же, с вирусами все понятно, большую часть мы их не знаем, бороться не умеем, а эффективных лекарств – единицы. Вот одна из таких единиц, которая в настоящее время известна, это препарат компании AbbVie против гепатита С, и состоит он из коктейля ингибиторов протеаз, вернее, два ингибитора протеаз и обратная транскриптаза. И только этот коктейль эффективно работает при лечении гепатита С, и в настоящее время можно сказать, что это вирусное заболевание излечимо. А в случае всех остальных вирусных заболеваний мы просто ждем, когда иммунная система и организм с ними справятся тем или иным образом. Практически во всех вирусах сначала синтезируется про-белок, а потом он начинает определенной специфичной протеазой процессироваться на группы остальных белков. Поэтому актуальность разработки технологий, основанных на поиске ингибиторов таких протеаз является исключительно актуальным и важным, это, в общем-то, целое направление. С моей точки зрения, одно из самых главных достижений этой работы - это попытка создать методологическую базу для поиска таких ингибиторов, в частности, для SARS-CoV-2. Ну и это пока только первый шаг, и в общем-то он сделан в правильном направлении, потому что если мы задумаемся, то для таких опасных вирусных заболеваний у нас существует очень ограниченное количество центров, которые обладают соответствующими боксами и системами, которые позволяют работать в таких условиях. Поэтому, если мы хотим действительно разрабатывать широким фронтом новые лекарственные препараты против вирусов, то должны существовать модели и системы, которые могут легко применяться в любой лаборатории, которая не обладает боксами уровня P4. Но вот то что в своей работе автор уделил очень большое внимание практически созданию такой безопасной модели, которая может использоваться практически в любой лаборатории (хотя на конечном итоге были проведены эксперименты с непосредственно вирусными частицами, но это проводилось в институте Гамалеи, который располагал соответствующими боксами) – это исключительно важно и актуально. Конечно, такая модель сложна, в любом случае, потому что нужно моделировать довольно сложные процессы, начиная от оболочечного белка, в данном случае – это белок М, механизмы его поведения внутри клетки. Ну и наиболее важно, как будет себя вести и где будет проявляться протеазная активность, потому что измерение протеазной активности,

равно как и ингибиторов в пробирке – это одно, а когда же мы переходим даже к клетке, это уже совершенно другая система, и ожидать, что эксперимент в пробирке совпадет с тем, что мы будем наблюдать внутри клетки – это довольно спорный вопрос, потому что примешивается очень много других взаимодействий, связанных прежде всего с локализацией. Поэтому вполне обоснованно автор уделил такое внимание разбору локализаций – где находится M-белок, и где может появиться специфическая протеаза PLpro, которая процессирует белок. Поэтому с моей точки зрения, у меня очень положительно впечатление об этой диссертации. И не только в плане борьбы с COVID-19. Это, вообще-то говоря, подход и создание новой методологической базы для того, чтобы вообще разрабатывать новые лекарственные препараты, ингибиторы против разного рода вирусов. И пытаться создавать ингибиторы, которые не просто бы поддерживали иммунную систему, а непосредственно блокировали репликацию и развитие вируса. Ну, как во всякой работе, есть, конечно, много вещей, которые хотелось бы уточнить. Я хотел бы сделать замечания, у меня их не так много. Естественно, все знают, что я специалист по FRET-парам, поэтому я ничего пропустить не могу, связанное с FRET. И когда я прочитал такую фразу, что «FRET представляет собой физическое явление переноса энергии между двумя хромофорами, спектры которых перекрываются менее чем на 10 нм», ну, по-видимому, здесь возникла путаница. Потому что, вообще-то говоря, расстояние, на котором происходит FRET, значительно меньше световой волны, и оно действительно составляет порядка 10 нм. А перекрывание – это интегральная величина. Скорее всего, это просто такая небольшая путаница. Второй момент – ну это скорее, хотелось бы, чтобы автор точнее писал в тексте. Такого рода FRET-сенсоры известны для разного рода протеаз, и там немаловажную роль играет целая структура линкера: есть сайт распознавания, который составляет 3–4, ну, максимум 5 аминокислот, но все это нужно экспонировать вне структуры таким образом, чтобы это стало доступно для атаки протеазой, и это обеспечивает линкер. Здесь был взят линкер аналогичный предыдущему на каспазу-4. Но, тем не менее, хотелось бы, чтобы автор полностью приводил эти данные: что из себя представляет линкерная структура, что это за линкер. Теперь по поводу детекции FRET. Ну, в общем-то, в данной работе вполне убедительно показано в контролях, что просто измерение соотношения интенсивностей донора и акцептора этой пары, тоже радиометрический режим измерения, он достаточно четко и достоверно регистрирует появление протеазы, протеазную активность. Но дело в том, что если посмотреть уже даже на клеточную структуру, у вас все же постоянно нарабатывается белок, это первый момент. А второй очень неприятный момент, который знают все спектроскописты, что

все современные лазерные системы, а практически все микроскопы построены на них, они жгут метки беспощадно. Там происходит очень большое выцветание меток, и этот процесс всегда нужно как-то учитывать. Поэтому, вообще-то говоря, есть более понятные решения для этих вещей, я считаю, что эти методы пойдут и дальше, по всей видимости, дальше эксперименты пойдут на мышах, что еще сложнее. И вот там с такого рода подходом будет крайне сложно. И специально для этих вещей существует техника временного разрешения. Вот она снимает массу вопросов, и у меня кстати вопрос, почему авторы не попытались продемонстрировать и посмотреть, что их система может эффективно работать с использованием техники временного разрешения. Потому что я глубоко убежден, что только эта техника позволит перейти на мышь. А с техникой, которую вы используете, на мышь вы не перейдете. Ну, естественно, автореферат написан очень хорошо, дает хорошее представление. Но как мне показалось, вот я литературу по цветным белкам знаю хорошо, но там куча идет аббревиаций, сокращений, от которых человек незнакомого с литературой по цветным белкам будет впадать в ступор, что бы это могло значить. И даже OSER-структура, которую вы описываете, больше ее знают те, кто работает с цветными белками, как тест на олигомерность белка, поэтому конечно же автореферат должен был быть дополнен подробным списком сокращений. А так, в целом, у меня очень положительное впечатление от этой диссертации, с моей точки зрения, это действительно одна из таких принципиальных работ, которая не столько завершает какой-то цикл, сколько открывает целое новое направление, с моей точки зрения – попытка создания моделей, которые могут использоваться широко в самых разнообразных учебных заведениях, университетах, институтах, которые не оборудованы такими боксами высокого уровня опасности, но которые позволяют работать с такими моделями и разрабатывать новые противовирусные препараты, а об актуальности этой тематики я уже говорил вначале. Ну, а все остальное, зачитывать во эти циферки?

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Не надо.

Официальный оппонент, д.х.н., А.П. Савицкий: Ну, с моей точки зрения, диссертация бесспорно заслуживает присвоения ученой степени кандидата биологических наук. Спасибо.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо, Александр Павлович. Ну, Лена, давайте отвечайте.

Соискатель Е.Л. Соколинская: Благодарю за замечания. С первым замечанием полностью согласна, действительно, в цитируемой статье автора Kim была использована некорректная формулировка, которая была далее перенесена мной в

литературный обзор. Действительно, область перекрытия спектра эмиссии донора и спектра возбуждения акцептора представляет из себя интегральную величину, от площади которой зависит эффективность FRET. И, естественно, она никакого критерия не имеет, а вот ферстеровский радиус, который представляет из себя расстояние между флуорофорами, при котором эффективность переноса равна 0.5, действительно составляет величину порядка нескольких нанометров. И по поводу второго замечания с линкерами, разрешите воспользоваться дополнительным слайдом. С замечанием также полностью согласна. Действительно, в тексте диссертационной работы следовало более подробно отразить аминокислотный состав линкеров и местоположение пептидной связи, которая расщепляется в ходе протеолиза. В первом биосенсоре на основе FRET-взаимодействия был использован линкер, схожий с таковым по дизайну с линкером каспазного сенсора, ранее разработанным в нашей лаборатории, с заменой сайта узнавания протеазы на последовательность LKGG, которая узнается PLpro. Однако в трех других транслокационных биосенсорах я провела модификацию линкера с целью увеличения специфичности, и здесь была использована в качестве сайта узнавания последовательность аминокислот между белками nsp2 и nsp3, которая действительно разрезается протеазой. Собственно, такая модификация линкера была осуществлена для увеличения специфичности узнавания. По поводу третьего замечания, то что можно было также использовать метод FLIM, с замечанием также согласна. Действительно, оценка эффективности FRET по измерению времени жизни донора – это метод очень активно используемый. Но в нашем случае мы не проверили таким образом по причине отсутствия FLIM-микроскопа, и исследование проводилось во время карантина по причине коронавирусной инфекции, и вследствие эпидемиологической обстановки мы не имели возможности воспользоваться FLIM-микроскопами коллег из других институтов. Но, действительно, измерение FRET по времени жизни донора было бы здесь методом более уместным. И по поводу четвертого замечания также полностью согласна, действительно, если приводится такое количество аббревиатур, то стоит делать список сокращений также и в автореферате.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо. Ну, поскольку Чуланов Владимир Петрович в командировке, доктор медицинских наук, Владимир Александрович зачитает его отзыв.

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников: *(Зачитывает отзыв официального оппонента. Отзыв положительный).* Ну, опять же, у меня в руках отзыв официального оппонента на эту диссертацию, на сегодняшнюю. Классически построен отзыв: актуальность обозначается, научная новизна четко совершенно прописана, это мы уже

слышали сегодня. Структура диссертации, опять же, 123 страницы, 203 ссылки, классическая структура. Обзор литературы написан ясно и подробно, дает полное представление о проблемах и задачах в данной области исследования. Материалы и методы подробно описывают все методики. Результаты и обсуждение – это две части. Первая часть – изучение олигомеризационных свойств М-белка SARS-CoV-2, результаты мы тоже слышали. И вторая часть посвящена разработке генетически кодируемых флуоресцентных сенсоров для изучения активности коронавирусной протеазы PLpro. Результаты опубликованы в 3 научных статьях и в 2 докладах. 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. Ну, и заключение, соответственно, работа соответствует критериям, тут все эти самые цифры, в том числе пункту 9, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", утверждено Постановлением Правительства РФ № 842, дальше с изменениями перечислены номера соответствующие, и диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология. Ну и, соответственно, официальный оппонент, зам.директора по научной работе и инновационному развитию ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр фтизиопульмонологии и инфекционных заболеваний» Минздрава России, доктор медицинских наук, Владимир Петрович Чуланов.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Ну что, отвечаем.

Соискатель Е.Л. Соколинская: Да, также благодарю за замечания. По поводу электронной микроскопии, действительно, использование такого метода является очень информативным, оно позволило бы более детально изучить видимые структуры. Мы думали об этом, но метод не был применен также по причине сложности доступа к электронному микроскопу. И кроме того, применение электронной микроскопии требует огромного наличия статистических данных, то есть там масштаб исследования довольно большой. А по поводу экспрессии совместно с другими структурными белками, это действительно замечание очень верное, и я думаю, что это будет темой

моего дальнейшего научного исследования, потому что коэкспрессия с другими структурными белками действительно может дать много информации.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо. Ну, следующий вопрос у нас – это дискуссия. Кто хотел бы выступить? Роман Гербертович, не будем дискуссию продолжать?

Д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов: Ну, я, по-моему, уже много сегодня сказал.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Ну хорошо.

Д.ф.-м.н. Р.Г. Ефремов: Могу попробовать. Ну, я согласен с первым оппонентом, что действительно интересное, перспективное направление вырисовывается, но просто единственное, на мой взгляд, конечно, хотелось бы более четко формулировать задачи, что касается особенно М-белка. Да, феномен интересный, с образованием таких протяженных олигомеров. Но с точки зрения структуры их – это, конечно, требует доказательств. Не удержусь, еще один тогда комментарий по представленным результатам. Дело в том, что интерфейс димеризации, по крайней мере в кристаллической структуре, в экспериментально установленной структуре, известен. Вы сравнивали этот интерфейс димеризации с возможными, потенциально экспонированными участками М-белка в модели, которую вы предлагаете, через С-конец? Потому что, судя по структуре, там не С-конец формирует интерфейс димеризации, а просто два белка слипаются своими протяженными боковыми альфа-спиралями, по-видимому, трансмембранными. То есть вы предлагаете в вашей модели, когда идет слияние мембран, стопки, другой механизм. Насколько это обоснованно? Ну, это тоже требует доказательств. Интересные идеи вы видите, олигомеры, но просто в дальнейшем, на мой взгляд, следует вот такие структурные вещи больше аргументировать и более строго. А так да, работа очень интересная, с удовольствием я послушал, и мое предложение – поддержать. Спасибо.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо. Ну что, Елена Леонидовна, последнее слово.

Соискатель Е.Л. Соколинская: Я хотела бы поблагодарить членов диссертационного совета за то, что заслушали мою работу, поблагодарить моего научного руководителя, Лукьянова Константина Анатольевича, к сожалению, он не смог онлайн присоединиться, но он проявлял очень чуткое руководство и сопровождал меня во время всего моего научного пути. Также хотела бы поблагодарить Богданова Алексея Михайловича и Баранова Михаила Сергеевича за неоценимые советы, которые они мне оказывали на протяжении моей работы, а также коллектив моей лаборатории, мои

дорогие коллеги, которые помогали создавать рабочую обстановку и в качестве моральной поддержки тоже меня сопровождали. Благодарю!

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Спасибо. Так, коллеги, предлагается состав счетной комиссии: Рубцов, Уткин и Олейников. Возражений нет? Нет. Спасибо. Прошу проголосовать членов ученого совета.

(Проходит тайное голосование)

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников: Уважаемые коллеги, члены ученого совета, значит, счетная комиссия завершила свою работу. По поводу Соколинской Елены Леонидовны - присутствовал на заседании 21 член ученого совета, роздано бюллетеней – 21, оказалось в урне бюллетеней – 21, «За» - 21, «Против» и недействительных нет.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Прошу голосовать, кто за?

Уч. секретарь, д.ф.-м.н., В.А. Олейников: Утверждаем.

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Утверждаем, спасибо. У нас по заключению совета есть замечания? Да.

(Д.х.н. Ю.Н. Уткин сообщает о незначительных редакторских правках в тексте заключения)

Председатель, д.х.н. А.И. Мирошников: Понял. Так, поправим. Так, коллеги, большое вам спасибо, это последнее заседание диссертационного совета в этом году. Всем спасибо.

Председатель диссертационного совета
академик, д.х.н.



Мирошников А.И.

Ученый секретарь диссертационного совета
д.ф.-м.н.

Олейников В.А.