

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
кандидата биологических наук Мануховой Татьяны Ивановны
на тему: «Вирус мозаики альтернантеры: вирионы, вирусоподобные и
структурно модифицированные частицы, структура и свойства»
по специальности 1.5.10. Вирусология

Диссертационная работа Татьяны Ивановны Мануховой посвящена изучению и сравнению структурных особенностей вирусных и морфологически сходных с ними вирусоподобных частиц вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт). Этот вирус был обнаружен относительно недавно, в 1999 году в Австралии. Позднее было установлено, что ВМАльт распространен повсеместно. Штамм ВМАльт, использованный в работе, был охарактеризован на кафедре вирусологии МГУ имени М.В. Ломоносова. ВМАльт представляет собой интерес не только в связи с относительной новизной его открытия, но и в связи с тем, что белок оболочки ВМАльт способен к полимеризации в широком диапазоне значений pH с образованием вирусоподобных частиц (ВПЧ). ВПЧ ВМАльт образованы белком оболочки, который в отличие от белков оболочки других потексвирусов способен к сборке в условиях *in vitro* при pH 4.0 и pH 8.0 в отсутствие нативной вирусной или любой другой РНК. Помимо вирионов и ВПЧ ВМАльт работа посвящена изучению структурно модифицированных частиц на их основе, образующихся при нагревании. Несмотря на то, что ранее были получены СЧ из ВПЧ ВМАльт, получить СЧ из вирионов в предшествующих работах не удавалось. В данном диссертационном исследовании были установлены условия, необходимые для образования СЧ

из вирионов. Дополнительно в работе проводится изучение возможности применения вирионов, ВПЧ и СЧ ВМАльт в различных биотехнологиях.

Рукопись диссертационной работы построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, глав «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 112 источников, а также одного приложения, включающего список растений-хозяев ВМАльт и симптомы инфекции на этих растениях. Работа изложена на 149 страницах и проиллюстрирована 34 рисунками и 8 таблицами, которые наглядно представляют полученные автором результаты.

Во введении изложены актуальность темы исследования и степень ее разработанности, цель и задачи исследования, научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы, личный вклад автора, методы и методология научного исследования, а также положения, выносимые на защиту, степень достоверности и результаты апробации работы.

Обзор литературы включает данные о структуре вирионов рода *Potexvirus*, а также о структуре вирусоподобных и нуклеокапсид-подобных частиц потексвирусов. Отдельная глава литературного обзора посвящена всесторонней характеристике объекта исследования – ВМАльт, что показывает высокий уровень осведомленности диссертанта об этом вирусе. Особый интерес в этой главе вызывает продемонстрированное по данным криоэлектронной микроскопии различие параметров спирали нуклеокапсид-подобных частиц, образованных БО ВМАльт и РНК-вектором на основе ХВК, и параметров вирионов других потексвирусов. Эти данные вместе с результатами, полученными в рамках данной работы, позволяют оценить вклад РНК в структуру образуемых частиц. Отдельное внимание в обзоре литературы уделено характеристике структурно модифицированных частиц различных вирусов растений, в том числе типового представителя рода *Potexvirus* X вируса картофеля. Данные, представленные в литературном

обзоре, активно привлекаются диссертантом в обсуждении полученных результатов.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание проведенных экспериментов и используемых в работе методов. При этом методы изложены детально и могут быть воспроизведены независимо. Одним из важных результатов данной работы является увеличение выхода очищенного вирусного препарата за счет правильного сочетания выбора растения-хозяина для накопления ВМАльт и оптимизации методики выделения. Усовершенствованный протокол выделения вируса вместе с классическими подходами по анализу белков и РНК приведены в главе «Материалы и методы». Вместе с тем автор дает описание методов микроскопии, связывания с флуоресцентными метками, экспрессии в бактериальной системе и последующей очистки рекомбинантных антигенов, которые были использованы в качестве модельных белков в данной работе. Кроме того, глава включает описание работы с опухолевыми клеточными линиями, на примере которых впервые было проведено исследование потенциала применения структурно модифицированных частиц ВМАльт в качестве носителей лекарственных препаратов для доставки в опухолевые клетки. Благодаря широкому спектру использованных подходов результаты работы являются не только достоверными, но и разносторонне характеризующими объект исследования.

В главе «Результаты и обсуждения» Татьяна Ивановна тщательно описывает проведенную экспериментальную работу. Полученные результаты хорошо проиллюстрированы информативными рисунками, обладающими высоким качеством, а для наглядности автор систематизировал данные в виде таблиц. В рамках диссертационной работы были приведены результаты, полученные с использованием различных подходов, подтверждающие различия состава доступных поверхностных аминокислотных остатков белка оболочки в составе вирионов и ВПЧ. Данные криоэлектронной микроскопии и результаты 3D-реконструкции подтверждают различия строения спирали

этих частиц. Дополнительно, автор провел исследование структуры белка оболочки в составе вирионов и ВПЧ, а также охарактеризовал его стабильность при нагревании. Логичным продолжением исследования вирионов и ВПЧ ВМАльт является изучение условий получения структурно модифицированных частиц из этих частиц – СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ}, соответственно – и их характеристика. Разница в структурном переходе с образованием СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} является отражением различий в структуре вирионов и ВПЧ, а разница в условиях формирования СЧ_{вир} и СЧ на основе других вирусов, в том числе X вируса картофеля, указывает на структурные особенности вирионов ВМАльт. В дополнение к этому, в заключительных разделах работы приводится исследование потенциала биомедицинского применения объектов работы. В частности, продемонстрирована возможность получения конъюгатов БО в составе ВПЧ ВМАльт с модельным белком с молекулярной массой 27 кДа, а также получены предварительные данные о возможности адсорбции и проникновения СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} ВМАльт в опухолевые клетки различных линий.

Выводы, сформулированные в работе, полностью соответствуют поставленным задачам и логически обоснованы. Результаты исследования были опубликованы в 4 рецензируемых научных изданиях и представлены на различных конференциях международного уровня.

При ознакомлении с диссертационной работой Мануховой Т.И. возникли следующие вопросы и замечания.

- Литературный обзор, как мне кажется, мог бы быть лучше иллюстрирован. Это особенно актуально для частей, которые посвящены структурам. Очевидно, что одна иллюстрация, демонстрирующая структуру, была бы гораздо более информативна для читателя, чем просто текст;

- Раздел 1 и 2 «Результатов и обсуждений» начинаются с введений, которые фактически дублирует «Введение» и «Литературный обзор» диссертации;
- Интересно узнать, проводились ли попытки количественной оценки экспонированных наружу а.о. лизина и цистеина БО в составе вирионов, ВПЧ ВМАльт, а также СЧ_{ВПЧ} и СЧ_{вир}?
- Несмотря на чрезвычайно интересные результаты по исследованию проникновения СЧ_{вир} и СЧ_{ВПЧ} в клетки саркомы Юинга (линия ES36) и глиобластомы человека (линия U87), не могу не отметить, что фибробласты человека (линия M19), которые использовались в данном эксперименте в качестве «нормальных клеток», являются в данном случае «контролем», с которым вряд ли уместно сравнивать представленные раковые линии.
- Местами текст перенасыщен сокращениями. Три-четыре подряд – сложно воспринимать.

Несмотря на это, важно отметить, что принципиальных замечаний, которые могли бы повлиять на положительную оценку работы у меня нет. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.10 Вирусология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Манухова Татьяна Ивановна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, доцент
исполняющий обязанности декана
факультета биоинженерии и биоинформатики
ФГБОУ ВО «МГУ имени М.В.Ломоносова»

Замятнин Андрей Александрович

Контактные данные:

тел.: +7 926 118 02 20,

e-mail: zamyat@belozersky.msu.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена диссертация:

03.01.03 – Молекулярная вирусология и

03.02.02 – Вирусология

Адрес места работы:

119234 г. Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 73

Тел.: +7 926 118 02 20; e-mail: zamyat@belozersky.msu.ru

