

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

Вирусные частицы представляют собой уникальный класс объектов. Особенности взаимодействий белков оболочки друг с другом и с нуклеиновыми кислотами обеспечивают формирование самособирающихся высокоупорядоченных структур разной геометрии. Размеры, форма, характер симметрии различных вирусных частиц определяют многообразные варианты их взаимодействия с живыми организмами, позволяют создавать широкий ряд препаратов практического назначения на основе модифицированных вирусов. При этом высокоаффинное связывание белков оболочки друг с другом, обеспечиваемое множественными контактами, создает возможность расширять разнообразие самосборных структур посредством мутационных изменений аминокислотной последовательности.

Однако возможности «конструктора» на основе вирусных белков оболочки этим не ограничиваются. Еще в середине XX века было показано, что при нагревании вируса табачной мозаики в определенных условиях нативная палочковидная структура трансформируется и образуются шарообразные частицы с объемом, близким к объему исходного вируса. Эти результаты позволяют конструировать новые корпускулярные структуры на основе вирусных белков оболочки и разрабатывать функционализированные препараты для решения разнообразных практических задач. Однако активное исследование способов получения и свойств таких структур, изменений состояния индивидуальных белков и последствий этих изменений, проявляющихся при самосборке искусственных частиц, началось лишь в последнее десятилетие. В качестве потенциальных причин этого возросшего

интереса к структурно-модифицированным частицам на основе вирусных белков оболочки отметим расширение возможностей тонкой оценки структур белков и белковых комплексов благодаря совершенствованию и адаптации к систематическим структурным исследованиям ряда эффективных методов – средств молекулярного дизайна рекомбинантных белков, направленной модификации строго определенных участков белковой глобулы новых форматов атомно-силовой микроскопии, ядерного магнитного резонанса, криоэлектронной микроскопии и др. Работы кафедры вирусологии Биологического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова обеспечили существенное дополнение и расширение знаний о структурно-модифицированных вирусных частицах.

Однако изучение этого класса объектов далеко от завершения. Представляют интерес открытые на сегодняшний день вопросы разнообразия вариантов структур, обеспечиваемого при варьировании исходных вирусов и условий их термообработки, влиянии изменений в структуре термоденатурированных белков оболочки вирусов на эффективность их взаимодействий при самосборке искусственных частиц, на форму и характер симметрии образующихся глобул.

С учетом вышеизложенного, диссертационное исследование Т.И. Мануховой, направленное на получение структурно модифицированных частиц на основе белка оболочки вируса мозаики альтернантеры, их сравнение с вирионами и вирусоподобными частицами, а также на оценку возможностей использования полученных частиц как основы для препаратов медицинского назначения, представляется крайне **актуальным**. В работе успешно интегрируются достижения последних лет в области методов изучения комплексов белковых молекул и анализируются характеристики полученных из нового вируса исходных и дополнительно модифицированных комплексов термоденатурированных белков оболочки.

Диссертация, автореферат и публикации Т.И. Мануховой свидетельствуют о достижении цели исследования и полноте решения всех

поставленных для этого задач. Планирование исследования, совокупность выполненных работ, полученные результаты, их интерпретация и сравнительная оценка, характеристика достигнутого прогресса в тематической области диссертации в полной мере отражены в подготовленных материалах.

В обзоре литературы рассмотрена структура белков оболочки и вирионов потексвирусов (к которым относился изучаемый Т.И. Мануховой вирус мозаики альтернантеры), механизмы взаимодействия белков оболочки при сборке межмолекулярных структур, особенности изучаемого вируса, включая его таксономическое положение, разнообразие и распространенность, а также накопленные данные об искусственных частицах, получаемых из термообработанных вирусных препаратов. Проведенный анализ литературы характеризуется полнотой охвата источников, корректным и систематическим представлением основных результатов предшественников. Материалы этого раздела убедительно обосновывают предложенный план исследования и формируют базу для интерпретации получаемых результатов.

Раздел «Материалы и методы» демонстрирует совокупность методов, освоенных Т.И. Мануховой в рамках диссертационной работы и примененных для ее выполнения. Данный перечень весьма широк и включает экспрессию рекомбинантных белков в бактериальной системе, их очистку и модификацию флуоресцентными реагентами, выделение вирусов из растительного материала с последующей очисткой белка оболочки и РНК, применение электрофореза для характеристики состава различных препаратов белков и нуклеиновых кислот, получение структурно модифицированных частиц из вирусного материала, их электронно-микроскопическую характеристику, применение криоэлектронной микроскопии, обработку изображений для пространственной реконструкции изучаемых вирусных препаратов, измерения спектров кругового дихроизма, иммунизацию и иммунофлуоресцентную микроскопию, а также изучение

взаимодействия структурно модифицированных частиц с животными клетками методами флуоресцентной микроскопии и проточной цитофлуориметрии. Данный ряд методов корректно выбран для решения поставленных задач и отражает высокую квалификацию соискателя.

Научную новизну работы определяет представленная в разделе «Результаты и обсуждение» совокупность данных структурной характеристики препаратов частиц, впервые полученных из вирионов белка оболочки вируса мозаики альтернантеры. В диссертации дается детальное сопоставление этих препаратов и ранее изучавшихся частиц из вирионов вируса табачной мозаики. Отмечаются отличия в условиях их образования, особенности термической перестройки вирионов и вирусоподобных частиц, изменения в экспонировании аминокислотных остатков при переходе к структурно модифицированным частицам. Тем самым исследование Т.И. Мануховой в значительной степени расширяет знания о получении и свойствах структурно модифицированных частиц вирусного происхождения.

Практическая значимость разработки обусловлена проведенной оценкой возможностей дальнейшей функционализации полученных частиц и исследованием их взаимодействия с разными видами животных клеток. Реструктурированный белок оболочки в составе полученных шарообразных частиц был успешно конъюгирован по поверхностно доступным аминокислотным группам с рекомбинантным белком на основе рецептор-связывающего домена белка S коронавируса SARS-CoV-2. Показаны отличия в адсорбции структурно модифицированных частиц из вирионов белка оболочки вируса мозаики альтернантеры при взаимодействии с животными клетками разных линий, в том числе возможность связывания с опухолевыми клетками. Результаты этих исследований Т.И. Мануховой формируют хорошую базу для дальнейшей разработки и характеристики препаратов биомедицинского назначения и подтверждают потенциал в этом отношении искусственных шарообразных структур вирусного происхождения.

Все работы, проведенные в рамках диссертационного исследования, корректно спланированы и детально описаны в диссертации и статьях Т.И. Мануховой. Интерпретация результатов опирается на содержательный анализ полученных массивов данных с применением современного методического инструментария и с учетом результатов предшественников, полученных в рамках тематически близких исследований. Это позволяет однозначно констатировать **достоверность, обоснованность положений, выводов и рекомендаций диссертационной работы.**

Изложение материала в диссертации хорошо структурировано; полностью представлен объем проведенных работ и взаимосвязи различных направлений исследования. Автореферат информативно отражает основные результаты, полученные соискателем, и их интерпретацию. По теме диссертации опубликованы четыре статьи: две в «PLoS ONE», одна в «Биохимии» и одна в «Сельскохозяйственной биологии». Результаты исследования представлены профессиональному сообществу на пяти профильных научных мероприятиях.

При ознакомлении с диссертацией и авторефератом возникли некоторые **замечания и вопросы.**

1. Рассматривая изменения структуры и доступности белка оболочки вируса мозаики альтернантеры в получаемых препаратах, автор обращается к известному числу различных аминокислотных остатков, количеству сайтов трипсинолиза. Однако читателю диссертации остается непонятным, насколько охарактеризован белок оболочки, что известно о его структуре. Вероятно, более конкретное рассмотрение имеющихся структурных данных сделало бы обсуждение перестроек и изменений ориентации более информативным.

2. При обсуждении рис. 13 диссертации (стр. 94) указывается увеличение среднего диаметра частиц при переходе от 0,1 мкг/мкл вируса к 1 мкг/мкл и отсутствие значительного увеличения размеров при последующем росте концентрации до 2 и 5 мкг/мкл. Эти наблюдения и итоговый

комментарий к сравнению результатов находятся в соответствии с внешним видом зависимости на рис. 13, где для концентраций 1, 2 и 5 мкг/мкл стандартные отклонения охватывают очень сильно перекрывающиеся интервалы диаметров частиц. Однако, согласно представленным на рис. 13 результатам дисперсионного анализа (ANOVA), различия в парах 0,1 – 1 мкг/мкл, 1 – 2 мкг/мкл и 2 – 5 мкг/мкл характеризуются величинами $p < 0,01$ (**), то есть во всех трех случаях статистически достоверны. Какая из этих оценок корректна?

3. При изучении адсорбции структурно модифицированных частиц из вирионов вируса мозаики альтернантеры на фибробластах (рис. 31 на стр. 131 диссертации) наблюдался нетривиальный эффект – статистически значимое отличие от контроля для меньшей концентрации частиц ($1,3 \times 10^9$ на лунку), тогда как для большей концентрации ($4,5 \times 10^9$ частиц на лунку) значимые отличия отсутствовали. Однако обсуждение этих результатов в тексте диссертации ограничивается вариантом $4,5 \times 10^9$ частиц на лунку.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Они носят частный и дискуссионный характер, не влияют на обоснованность положений, выносимых на защиту, и не снижают общую положительную оценку работы.

Диссертация Т.И. Мануховой 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. Диссертация 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 химических наук,
ведущий научный сотрудник
лаборатории иммунобиохимии
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук» (ФИЦ Биотехнологии РАН)
ЖЕРДЕВ Анатолий Виталиевич

« ___ » мая 2024 г.

Контактные данные:

тел.: 8 (495) 954-28-04,
e-mail: zherdev@inbi.ras.ru
Специальность, по которой официальным оппонентом
защищена докторская диссертация:
1.5.4. Биохимия

Адрес места работы:

119071 Москва, Ленинский проспект, д. 33, стр. 2
ФИЦ Биотехнологии РАН, лаборатория иммунобиохимии
Тел.: 8-495-954-52-83; e-mail: info@fbras.ru

*Подпись сотрудника ФИЦ Биотехнологии РАН
Жердева Анатолия Виталиевича удостоверяю*

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН, к.б.н.

А.Ф. Орловский

« ___ » мая 2024 г.

М.П.