

ОТЗЫВ официального оппонента

доктора биологических наук Дейнеко Елены Викторовны
на диссертационную работу Гладышевой Анастасии Витальевны
«Изменчивость вирусных белков и геномной ssRNA(+) флавивирусов и
энтеровирусов при культивировании *in vitro*», представленную к защите на
соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность темы диссертационной работы

Примечательным событием первой декады 21 века следует назвать серию биологических открытий в рамках метагеномных исследований, которые позволили по-новому взглянуть на мир вирусов и его эволюцию. Стало очевидным, что вирусы являются наиболее распространенными биологическими объектами на Земле. В результате взаимодействия вирусов с клеточными формами в ходе эволюции выработано огромное разнообразие различных систем нападения и защиты, этот процесс непрерывен и постоянно совершенствуется как со стороны вирусов, так и со стороны клеточных форм жизни. Высокая степень изменчивости некоторых форм вирусов обеспечивает им преимущества в «гонке вооружений» между вирусами и клетками, что может сопровождаться прогрессирующим распространением инфекции, в том числе среди человеческой популяции и становиться причиной возникновения широкомасштабных эпидемий. Поскольку возникновение и широко масштабное распространение вирусных инфекций, обусловленное высокой скоростью мутаций в вирусном геноме, все еще не поддается прогнозированию, то совершенно очевидно, что угроза прогрессирующего распространения вирусных инфекций, переходящих в пандемии, продолжает существовать. Ярким подтверждением этому является широко масштабная вспышка коронавируса SARS-CoV-2. Именно к этой группе вирусов, геном которых представлен одноцепочечной РНК положительной полярности, относятся и такие вирусы как вирус Западного Нила, Зика, Денге, Желтой лихорадки и Японского энцефалита, которые только за последние несколько лет явились причиной многих сотен миллионов случаев тяжелых заболеваний, часто сопровождающихся смертельными исходами. Среди вирусов, геном которых представлен одноцепочечной РНК положительной полярности, имеются и вирусы с локальным распространением, эндемичные для некоторых территорий, например, вирус клещевого энцефалита. Такие вирусы также представляют постоянную угрозу местному населению и являются причинами локальных вспышек тяжелых инфекционных заболеваний. В связи с этим, проведение исследований, направленных на выявление особенностей репликации вирусов в различных типах клеток, приобретает особую актуальность и позволит получить новые данные по механизмам адаптации исследуемой группы вирусов к новому хозяину. Важность и значимость проведения исследований в данном направлении подчеркивается с одной стороны фундаментальным характером исследуемой проблемы, связанной с выявлением механизмов преодоления вирусами межвидовых барьеров, что позволяет им становиться патогенными для человека. С другой стороны, выявление особенностей модификации вирусного генома при экспансии различных типов клеток может послужить основой для выявления горячих точек в геноме, связанных с прогрессирующим распространением вирусной инфекции, и позволит строить прогнозы относительно ее

распространения. Следует отметить, что вышеперечисленные особенности подчеркивают не только актуальность выбранной темы исследований диссертанта, а также и ее широкую социальную значимость.

Разработанные к настоящему времени методы и подходы в области молекулярной биологии, клеточной и синтетической биологии, а также биоинформатики, позволяют по-новому взглянуть на открывающиеся возможности оценки вариабельности геномной вирусной ssRNA(+) при адаптации исследуемых вирусов к различным культурам клеток. Применение методов современной биологии дает возможность идентифицировать пространственную структуру вирусных белков, а также нетранслируемых областей генома и провести сравнительный анализ их изменений в зависимости от условий культивирования вируса в различных типах клеточных культур. Именно в этом русле исследований и выполнена диссертационная работа А.В. Гладышевой, нацеленная на анализ вариабельности геномной вирусной РНК, а также на выявление особенностей пространственной структуры вирусных белков и нетранслируемых областей (5' и 3' UTR) нескольких видов вирусов, являющихся представителями флавивирусов и энтеровирусов.

В диссертационной работе проведена адаптация различных штаммов вируса клещевого энцефалита, Зика и ECHO 3 к культурам клеток, выполнено их полногеномное секвенирование и получены молекулярно-генетические характеристики анализируемых штаммов. Исследована вариабельность пространственной структуры вирусных белков и нетранслируемых областей (5' и 3' UTR) вируса клещевого энцефалита штамма С11-13, вируса Зика штамма Faranah/18, вируса ECHO 3 штамма Sakhalin-11.293, а также определены полноразмерные нуклеотидные последовательности двух новых штаммов – Kindia tick virus (KITV), проведена их таксономическая идентификация и филогенетический анализ. На основании моделей и аннотированных вторичных структур 5' и 3' UTR KITV проведен сравнительный анализ пространственной организации этих структур в сегментированной ssRNA(+) с аналогичными структурами несегментированной ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов.

Научная новизна и практическая значимость исследования и полученных результатов.

Научная новизна диссертационной работы Гладышевой А.В. определяется тем, что диссертантом продемонстрированы широкие возможности использования современных методов молекулярной биологии и биоинформатики для выявления изменчивости вирусных белков и геномной ssRNA(+) на примере нескольких штаммов флавивирусов и энтеровирусов при их адаптации к различным клеточным культурам. Диссертантом впервые предсказаны вторичные структуры для 5' и 3' UTR для нового многокомпонентного вируса KITV с использованием двух выделенных новых штаммов этого вируса, а также впервые проведен сравнительный анализ этих областей с аналогичными областями флавивирусов и энтеровирусов. Основываясь на уникальных данных об особенностях организации исследуемых районов, диссертантом были сформулированы гипотезы об их значимости в процессе репликации многокомпонентных вирусов. Диссертантом охарактеризованы полногеномные последовательности вируса Зика африканского генотипа, а также вируса клещевого энцефалита сибирского региона, получены новые данные об их вариабельности при адаптации к различным типам клеток. Для вируса клещевого энцефалита предсказаны модели пространственной организации структур белков NS3 и NS5, а также вторичной структуры 3' UTR области. Для вируса Зика

выявлены новые мутации и новые сайты связывания MS11-белка в области 3' UTR вирусного генома. Полученные результаты представляют несомненный интерес и могут быть полезны исследователям, работающим в направлении выявления молекулярных факторов, определяющих патогенные свойства РНК-содержащих вирусов, что подчеркивает значимость данной работы не только с точки зрения фундаментальной науки, но и практического применения при разработке прогнозов против вирусов с высокой степенью изменчивости.

Обоснованность и достоверность научных положений и выводов

Во Введении диссертантом убедительно обоснована актуальность исследования, чётко сформулированы цели и задачи, а также положения, выносимые на защиту. Основной раздел диссертации содержит описание полученных результатов исследования и их обсуждение. Написан хорошо, представленный материал изложен логично, достаточно иллюстрирован. Обсуждение результатов проведено грамотно. Обоснованность полученных результатов обеспечена применением современной научно-методической базы, с использованием современных методов исследований.

Достоверность результатов работы не вызывает сомнений. Экспериментальные данные получены на большом объёме проведённых лабораторных исследований с применением современных методик. Сделанные выводы строго базируются на полученных результатах исследования и полностью им соответствуют. Автореферат соответствует основным положениям исследований и выводов, представленным в диссертационной работе.

По материалам диссертации представлено три работы, опубликованных в журналах, входящих в список ВАК, одного препринта и 12-ти тезисов в рецензируемых сборниках научных конференций. Работа прошла апробацию на ряде российских и международных конференциях. Публикации автора полностью отражают основные результаты проведённых исследований.

Общая характеристика диссертационной работы

Диссертационная работа Гладышевой А.В. построена по классической схеме. Работа изложена на 143-х страницах, состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Список литературы содержит 192 источника зарубежной литературы. Работа иллюстрирована 26 рисунками и 12 таблицами.

Во Введении изложена актуальность темы и степень ее разработанности, сформулированы цель и задачи исследования, научная новизна и практическая значимость работы, а также основные положения, выносимые на защиту, апробация работы и личное участие автора. В обзоре литературы приведены современные данные литературы об особенностях организации генома РНК-содержащих вирусов, данные о морфологии вириона флавивирусов и энтеровирусов, их распространении и степени инфекционности. Представлены современные данные о функциональной значимости 5' и 3' UTR исследуемых вирусов, имеющих важное значение для репликации, трансляции, иммунной регуляции и патогенеза в целом.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны использованные автором материалы и методы исследования, включая компьютерное моделирование, культивирования и титрования вирусов *in vitro*, молекулярно-биологические методы,

связанные с выделением нуклеиновых кислот, обратной транскрипцией, ПЦР, а также анализом нуклеотидного состава генома исследуемых вирусов по Сенгеру и NGS. В целом данная глава свидетельствует о том, что работа выполнена на высоком методическом уровне с использованием современных молекулярно-биологических подходов и компьютерного анализа.

В главе «Результаты и обсуждение» представлены результаты собственных исследований, где последовательно приводятся этапы проведения экспериментов с последующим обсуждением. Логически данная часть работы разделена на 4 подраздела, каждый из которых посвящен одному из четырех исследуемых вирусов, геном которых представлен одноцепочечной РНК положительной полярности – вирусу клещевого энцефалита штамма С11-13, вирусу Зика штамма Faranah/18, энтеровирусу ЕСНО 3 штамма Sakhalin-11.293 и многокомпонентному флавиподобному вирусу KITV двух штаммов: KITV/2018/1 и KITV/2018/2. Результаты исследований каждого из этих подразделов представлены по однотипной схеме, включающей описание адаптации вируса к различным культурам клеток, анализ результатов его полногеномного секвенирования, выявление и локализацию аминокислотных замен относительно трехмерной структуры вирусных белков, сравнительный анализ 5' и 3' UTR районов генома исследуемого штамма вируса с другими штаммами, моделирование их вторичных структур и выявление изменений в этих районах, индуцированных в результате адаптации исследуемого вирусного штамма к различным клеточным культурам. Полученные результаты свидетельствует о том, что при адаптации исследуемых штаммов вирусов к лабораторным клеточным культурам выявляются различные генетические вариации генома, связанные с аминокислотными заменами в структуре вирусных белков, а также различные изменения в нетранслируемых районах РНК. Поскольку данные районы вирусного генома могут функционировать как цис-действующие элементы во время репликации и трансляции, выявляемые изменения отражают степень их адаптации к новым клеточным формам. В заключении диссертант приходит к выводу о способности вирусов редактировать свои геномы за счет мутаций в структуре вирусных белков и регуляторных 5' и 3' UTR районов генома.

Замечания.

При прочтении диссертации у меня возникли некоторые вопросы, главным образом, дискуссионного характера:

1. Производилась ли первоначальная оценка гетерогенности вирусной популяции? Появление аминокислотных замен действительно связано с вирусной адаптацией к культурам клеток или же это отбор квазивидов в процессе жизнедеятельности вируса?
2. Можно ли рассматривать полученные данные относительно роли предсказанных пространственных моделей принципиально важных вирусных белков и нетранслируемых регионов геномной РНК различных вирусов для разработки противовирусных терапевтических препаратов нового поколения, поскольку существующие методы предсказания моделирования вирусных белков и вторичных структур РНК имеют достаточно большой ряд ограничений? Каковы перспективы получения пространственных моделей экспериментальными методами?

Заключение

В целом, диссертационная работа оставляет очень хорошее впечатление. Указанные незначительные недостатки носят в основном дискуссионный характер и не умаляют достоинств выполненной работы. Диссертационная работа А.В. Гладышевой «Изменчивость вирусных белков и геномной ssRNA(+) флавивирусов и энтеровирусов при культивировании *in vitro*» представленная на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности «1.5.3 - молекулярная биология», является завершённым научно-исследовательским трудом, имеющим существенное значение для молекулярной биологии, вирусологии и здравоохранения.

В диссертации проведён глубокий анализ изменчивости вирусных белков и геномной ssRNA(+) на примере нескольких штаммов флавивирусов и энтеровирусов, культивируемых в различных клеточных линиях. Полученные автором результаты достоверны, положения и выводы обоснованы. Автореферат соответствует основному содержанию диссертации. Опубликованные автором научные статьи полностью соответствуют теме диссертационной работы.

Диссертационная работа А.В. Гладышевой отвечает критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842, с изменениями постановления Правительства РФ от 21.04.2016 г. №335 «О внесении изменений в Положении ученых степеней», а ее автор Гладышева Анастасия Витальевна заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук специальности 1.5.3 - молекулярная биология.

Дейнеко Елена Викторовна,

доктор биологических наук по специальности 03.02.07 - Генетика,
профессор, главный научный сотрудник, зав. лабораторией
бионинженерии растений

/Дейнеко Е.В./

Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Федеральный исследовательский центр
Институт цитологии и генетики СО РАН»
пр-т академика Лаврентьева, 10, 630090, Новосибирск
+7-913-740-8108

эл.почта: deineko@bionet.nsc.ru

22 августа 2022 г.

Подпись д.б.н., проф. Дейнеко Е.В. заверяю:

Орлова Галина Владимировна
Ученый секретарь

ФГБНУ «ФИЦ Институт цитологии и генетики СО РАН»
кандидат биологических наук



/Орлова Г.В./