

## О результатах публичной защиты диссертации

**ИВИНА Юрия Юрьевича**

диссертация на тему: «Роль секьюрити-белков L и 2A вируса энцефаломиокардита в развитии клеточной патологии», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

Диссертационный совет 24.1.255.01 на базе ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита) принял решение о присуждении ученой степени кандидата биологических наук по специальности: 1.5.10. Вирусология ИВИНУ Юрию Юрьевичу (Протокол № 27 от 6 ноября 2024 года).

Присутствовали: Ишмухаметов А.А. д.м.н., профессор, академик РАН (1.5.10. Вирусология), Ткаченко Е.А. д.м.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Белякова А.В. к.б.н. (1.5.10. Вирусология), Егоров А.М. д.б.н., профессор, академик РАН (1.5.10. Вирусология), Костинов М.П. д.м.н., профессор, член-корр. РАН (1.5.10. Вирусология), Дзагурова Т.К. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Иванов А.П. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Карганова Г.Г. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Еровиченков А.А. д.м.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Гамбарян А.С. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Калинина Н.О. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Иванова О.Е. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Карпова О.В. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Кюрегян К.К. д.б.н., профессор РАН (1.5.10. Вирусология), Козловская Л.И. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Колясникова Н.М. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Бутенко А.М. профессор, д.б.н. (1.5.10. Вирусология).

Председатель (заместитель председателя)  
диссертационного совета 24.1.255.01  
профессор, доктор медицинских наук



Е.А. Ткаченко

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.255.01  
кандидат биологических наук

А.В. Белякова

«6» ноября 2024 г.

## ПРОТОКОЛ № 27

заседания совета по защите диссертаций на соискание ученой степени доктора наук, соискание ученой степени кандидата наук  
24.1.255.01 на базе ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН»  
(Институт полиомиелита)

от 6 ноября 2024 года  
11:00 час. МСК.

По списку членов диссертационного совета – 22 чел.

Присутствовало на заседании – 17 чел.

Председатель (заместитель председателя)  
диссертационного совета

– профессор, д.м.н. Ткаченко Е.А.

Заместитель председателя

– профессор, д.м.н. Еровиченков

Ученый секретарь  
диссертационного совета

– к.б.н. Белякова А.В.

**Присутствовали члены диссертационного совета:**

Ишмухаметов А.А. д.м.н., профессор, академик РАН (1.5.10. Вирусология), Егоров А.М. д.б.н., профессор, академик РАН (1.5.10. Вирусология), Костинов М.П. д.м.н., профессор, член-корр. РАН (1.5.10. Вирусология), Дзагурова Т.К. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Иванов А.П. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Карганова Г.Г. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Гамбарян А.С. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Калинина Н.О. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Иванова О.Е. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Карпова О.В. д.б.н., профессор (1.5.10. Вирусология), Кюрегян К.К. д.б.н., профессор РАН (1.5.10. Вирусология), Козловская Л.И. д.б.н. (1.5.10. Вирусология), Колясникова Н.М. д.м.н. (1.5.10. Вирусология), Бутенко А.М. профессор, д.б.н. (1.5.10. Вирусология).

### **ПОВЕСТКА ЗАСЕДАНИЯ:**

1. Защита диссертации ИВИНА Юрия Юрьевича на тему: «Роль секьюрити-белков L и 2A вируса энцефаломиокардита в развитии клеточной патологии», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология. Работа выполнена в лаборатории биохимии Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

**Научный руководитель:** Ишмухаметов Айдар Айратович, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН, генеральный директор Федерального государственного автономного научного учреждения «Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита).

**Официальные оппоненты:**

Забережный Алексей Дмитриевич – доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН, директор Федерального государственного бюджетного научного

учреждения «Всероссийский научно-исследовательский и технологический институт биологической промышленности».

Иванов Александр Владимирович – доктор биологических наук, главный научный сотрудник, заведующий лабораторией биохимии вирусных инфекций Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

**Ведущая организация:**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова».

**СЛУШАЛИ:** доклад по диссертации ИВИНА Юрия Юрьевича на тему: «Роль секьюрити-белков L и 2A вируса энцефаломиокардита в развитии клеточной патологии», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

**Актуальность темы исследования**

Течение вирусной инфекции в многоклеточных организмах и отдельных клетках представляет собой чрезвычайно сложный процесс, в который вовлечены многие десятки молекул-участников со стороны вируса и клеток. Будучи облигатными клеточными паразитами, вирусы способны размножаться только внутри жизнеспособных клеточных структур, используя для этого энергетические и структурные ресурсы хозяина. Вирусные инфекции – неотъемлемая часть жизни многоклеточных организмов и эволюции всего эукариотического мира. В ходе совместного существования эти части органического мира выработали множество сценариев взаимодействия. В зависимости от типа клеток размножение вирусов может вызывать их гибель, индуцируя развитие серьезных заболеваний у многоклеточных организмов, или, напротив, не приводит к существенным изменениям в жизни хозяина. Понимание закономерностей течения процессов в зараженной клетке – необходимое условие для эффективной борьбы против вирусных патогенов, вызывающих болезни.

Развитие клеточной патологии при вирусной инфекции – это результат взаимодействия клеточных защитных противовирусных систем и вирусных противовозащитных инструментов. В геноме клетки закодировано множество белков, главной целью которых является поиск чужеродных молекул и структур и запуск каскадов реакций, направленных на подавление размножения патогена в рамках одной клетки и распространения в соседние. Эти белки составляют основу защитной системы внутреннего клеточного иммунитета. В нее входят молекулы, вовлеченные в интерфероновый ответ, запуск апоптотической программы и многих видов индуцируемого клеточного стресса, РНКазы и многие другие белки. В ответ на реакции клеточного иммунитета и вирусы эволюционно выработали инструменты, позволяющие ограничивать действие защитных систем, модифицирующие внутриклеточную среду для собственного эффективного размножения. Такие вирусные белки были названы факторами вирулентности или секьюрити-белками. Ввиду ограниченности размера вирусного генома по сравнению с клеточным, такие белки должны иметь максимально возможную функциональность, высокую вариабельность и генетическую нестабильность, что делает их интереснейшим объектом для исследования. Одним из важнейших свойств секьюрити-белков является участие в модификации клеточной смерти. От того, каким типом клеточной смерти погибнет клетка: апоптотическим, некротическим или иным, зависит потенциальное распространение инфекции и общее течение заболевания.

Семейство *Picornaviridae* состоит из самых многообразных групп вирусов, многие из которых способны вызывать тяжелые заболевания у человека и животных. Зачастую, представители

этого семейства – литические вирусы, инфицирование которыми приводит к гибели клеток и выходу новых вирусных частиц. К такому типу относится вирус энцефаломиокардита 1 серотипа (EMCV-1) представитель рода *Cardiovirus*, один из модельных представителей семейства. EMCV-1 способен инфицировать многие виды позвоночных животных, в том числе человека, обезьян, свиней, мышей, вызывая развитие миокардита, энцефаломиелита и диабета. Вспышки распространения этого вируса являются одной из важных экономических проблем свиного животноводства. В составе генома EMCV-1 выделяют по меньшей мере два секьюрити-белка: L и 2A. Изучение свойств и механизмов их взаимодействия с клеточным иммунитетом повысит уровень понимания биологии пикорнавирусов и молекулярных основ вызываемых ими заболеваний.

#### **Степень разработанности темы исследования**

Свойства секьюрити-белков пикорнавирусов изучены недостаточно. Лишь белки L и 2A представителей родов *Aphthovirus*, *Erbovirus*, *Enterovirus* и *Cardiovirus* являются функционально охарактеризованными. У остальных представителей семейства свойства белков предсказаны теоретически. EMCV-1, представитель рода *Cardiovirus*, является одним из модельных и хорошо изученных представителей семейства. Несмотря на это, существует множество противоречивых данных относительно функциональных свойств его секьюрити-белков. Существует ряд научных работ, в которых авторы приписывают каждому из них множество функций, однако часто результаты исследований противоречат друг другу. К примеру, многие работы посвящены изучению белков L или 2A вне контекста вирусного генома с использованием *in vitro* подходов и различных генно-инженерных систем невирусной природы. Роль в подавлении клеточной трансляции, как одного из способов борьбы с иммунитетом клетки, как и антиапоптозные функции приписывают то одному секьюрити-белку L, то другому – 2A. Механизм функционирования обоих белков остается неясен. Противоречия в описании функциональных свойств секьюрити-белков, видимо, связаны с различными моделями и способами изучения этих свойств, в том числе с использованием различных клеточных линий. Для более глубокого и системного изучения функций обоих белков требуется использовать подход, который основан на инактивации секьюрити-белков по отдельности и совместно путем внесения мутаций в геном EMCV-1 и последующем сравнении свойств полученных мутантов.

**Целью настоящего исследования** являлось изучение в рамках одной экспериментальной системы роли белков L и 2A модельного вируса энцефаломиокардита 1 серотипа в процессе гибели зараженных клеток и модификации трансляционных процессов.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи исследования**:

1. получить и охарактеризовать мутантные EMCV-1 по белку 2A и по белкам L и 2A одновременно;
2. изучить трансляционную активность в клетках HeLa и ВНК-21 при инфекции мутантными EMCV-1 по L и 2A белкам;
3. изучить особенности гибели клеточных культур HeLa, ВНК-21 и RD при инфекции мутантными EMCV-1 по L и 2A белкам;
4. изучить возможность ингибирования развития патологических процессов в зараженных клетках при подавлении развития апоптоза и работы вирусных противовозрастных механизмов.

#### **Научная новизна**

Впервые получен жизнеспособный EMCV-1 с функционально инактивированными обоими секьюрити-белками L и 2A, что доказало факультативную роль секьюрити-белков в размножении вируса энцефаломиокардита. С использованием двух клеточных культур разного

происхождения (HeLa и ВНК-21) показано отсутствие влияния белка 2А на течение трансляционных процессов в зараженных клетках. Обнаружено постадийное ингибирование клеточной трансляции в течение инфекции, зависимое от присутствия в геноме активного белка L.

Впервые с использованием нескольких клеточных линий показано, что тип клеточной смерти при инфекции EMCV-1 зависит как от активности белков L и 2А, так и от типа культуры клеток. Выявлена зависимость активности секьюрیتی-белков и типа клеточной смерти в трех клеточных культурах.

Впервые описана гибель клеток при кардиовирусной инфекции, сочетающая некротические и апоптотические признаки. Показана возможность ингибирования развития патологических процессов в зараженных клетках путем подавления развития апоптотической программы и нарушения работы вирусных секьюрیتی-белков при активном вирусном размножении.

### **Теоретическая и практическая значимость работы**

В современном мире новые вирусные возбудители заболеваний человека и животных выявляются все чаще. Геномы практически всех известных вирусов кодируют белки, участвующие в подавлении клеточного иммунитета – секьюрیتی-белки. В настоящее время известно два представителя рода *Cardiovirus*, к которому относится EMCV-1, вызывающие заболевания человека, слабоизученные вирус Саффолд и вирус виллоуского энцефалита. Данные о влиянии белков L и 2А EMCV-1 на синтез клеточных и вирусных белков и выбор типа клеточной смерти при инфекции углубляют фундаментальное понимание течения процессов внутри зараженной клетки. Решение поставленных задач на модельном объекте, которым является EMCV-1, является основой для построения модели взаимодействия пикорнавирусов с клеткой, что крайне полезно для изучения белков других вирусных групп. В настоящей работе мы показали возможность подавления развития патологических процессов в зараженной клетке при сохранении размножения вируса путем ингибирования развития программы апоптоза и нарушения функционирования секьюрیتی-белков. Этот феномен не только доказывает фундаментальную гипотезу о природе гибели клетки при инфекции в результате взаимодействия клеточных защитных и вирусных противовирусных программ, но и имеет потенциальную практическую значимость. Поскольку гибель зараженной клетки запрограммирована генетически, но является управляемой, можно влиять на развитие клеточной патологии при инфекции, путем блокирования этих программ. В ходе исследования мы блокировали апоптотическую программу, используя ингибиторы других типов гибели клеток можно достичь еще более впечатляющих результатов. Мутации активных центров секьюрیتی-белков можно заменить на химическую инактивацию их функций. Применение химической инактивации функций белков и программ гибели внутри клетки может привести к ингибированию развития клеточной патологии и, как следствие – возникновению нового комплексного подхода к лечению вирусных заболеваний. Изученные свойства аттенуированных вирусных мутантов EMCV-1, имеющих функционально инактивированные секьюрیتی-белки, являются теоретической основой для создания живых аттенуированных вакцин против кардиовирусов. Подход, используемый в исследовании, который заключается в создании вирусных мутантов по исследуемым белкам, их адаптации к клеточным культурам с целью повышения жизнеспособности, может быть применен для изучения свойств многих вирусных секьюрیتی-белков.

### **Методология и методы исследования**

Для выполнения исследований и решения поставленных задач с учётом теоретической базы использовали современные лабораторные методы, включая вирусологические, иммунологические, цитологические и молекулярно-генетические, отражающие новизну научных подходов в изучаемой области. Основным научный подход работы заключался в создании мутантных вирусов энцефаломиокардита 1 серотипа с функционально инактивированными секьюрити-белками L и 2A и последующем сравнении течения инфекции нескольких клеточных линий мутантными вирусами и вирусом дикого типа.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. Разработана схема получения жизнеспособных мутантных вирусов EMCV-1 с функционально инактивированным белком 2A и белками L и 2A совместно.
2. При функциональной инактивации белка 2A EMCV-1 происходит активация каспазо-зависимой программы гибели зараженных клеточных культур. Гибель клетки при этом может сопровождаться одновременно некротическими и апоптотическими признаками.
3. При функциональной инактивации белка L EMCV-1 путем разрушения домена Zn-палец активация апоптотической программы гибели зараженных клеточных культур зависит от типа клеток.
4. При функциональной инактивации белка 2A EMCV-1 путем введения делеции с 11 по 125 аминокислотный остаток не происходит изменений в процессе подавления клеточной трансляции при инфекции, но нарушается процессинг капсидных белков.
5. Одновременная инактивация белков L и/или 2A EMCV-1 и ингибирование активации каспаз приводит к торможению развития программ клеточной гибели при инфекции EMCV-1.

#### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Научные положения диссертации соответствуют паспорту специальности 1.5.10. Вирусология. Результаты проведенного исследования соответствуют областям исследований: пунктам 3, 4, 6 и 7 паспорта специальности 1.5.10. Вирусология.

#### **Выводы**

1. Функциональная инактивация секьюрити-белков L и 2A по отдельности и совместно не приводит к полной потере жизнеспособности EMCV-1.
2. Белок L EMCV-1 способствует специфическому ингибированию трансляции клеточных белков и ингибирует развитие неспецифического подавления синтеза белков в клетках HeLa.
3. Белок 2A EMCV-1 не участвует в регуляции синтеза клеточных белков в зараженных клетках HeLa и ВНК-21. Белок 2A участвует в процессинге капсидных белков EMCV-1.
4. Мутации белка 2A, нарушающие его функционирование, приводят к развитию каспазо-зависимой программы гибели в зараженных клетках HeLa, ВНК-21 и RD. Мутации белка L, нарушающие его функционирование, приводят к развитию каспазозависимой программы гибели в зараженных клетках HeLa и RD. Тип клеточной смерти при инфекции EMCV-1 зависит от активности секьюрити-белков и типа клеток.
5. Совместное подавление активации каспаз и ингибирование секьюрити-белков L и 2A вируса энцефаломиокардита 1 серотипа, проявляющие антиапоптотические свойства, приводит к ингибированию процесса гибели клеток и повышению их жизнеспособности.

**Официальные оппоненты** - Забережный А.Д. д.б.н., профессор, член-корреспондент РАН, Иванов А.В. д.б.н. – *дали положительные отзывы на диссертацию.*

**Ведущая организация** – Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова» - *дала положительный отзыв на диссертацию.*

**Счетная комиссия избрана в составе:** председатель – д.м.н. Колясникова Н.М., члены комиссии – д.м.н. Иванова О.Е., д.м.н. Дзагурова Т.К.

Результаты голосования: диссертационный совет в количестве 17 человек, из них 16 докторов наук по специальности 1.5.10. Вирусология, участвовавших в заседании, из 22 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за – «17», против – «нет», недействительных бюллетеней – «нет».


*Протокол тайного голосования утвержден открытым голосованием.*

**ПОСТАНОВИЛИ:** основываясь на результатах тайного голосования присудить ИВИНУ Юрию Юрьевичу ученую степень кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. Вирусология.

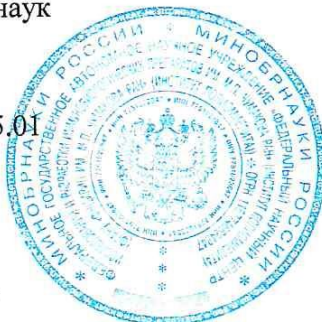
Председатель (заместитель председателя)  
диссертационного совета 24.1.255.01  
профессор, доктор медицинских наук

 Е.А. Ткаченко

Ученый секретарь  
диссертационного совета 24.1.255.01  
кандидат биологических наук

 А.В. Белякова

«6» ноября 2024 г.



МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное автономное научное учреждение  
"Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических  
препаратов им. М.П. Чумакова РАН" (Институт полиомиелита)  
ФГАНУ «ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН» (Институт полиомиелита)  
(наименование организации)

Форма по ОКУД  
по ОКПО

Код
0301005
01895045

## ПРИКАЗ

Номер документа	Дата составления
243-к	02.11.2024

«О возложении полномочий  
председателя диссертационного совета 24.1.255.01»

В связи с тем, что являюсь научным руководителем Ивина Ю.Ю. по диссертации на тему: «Роль секьюрити-белков L и 2A вируса энцефаломиокардита в развитии клеточной патологии», представленной к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.10. – «Вирусология», в соответствии с Приказом Минобрнауки № 1093 от 10.11.2017 г. (внесение изм. Приказа Минобрнауки № 1186 от 14.12.2023 г. п. 22 п.п. 1).

**ПРИКАЗЫВАЮ:**

Исполнение обязанностей председателя диссертационного совета 6 ноября 2024 г. возложить на заместителя председателя диссертационного совета 24.1.255.01 д.м.н., проф. Ткаченко Е.А.

Руководитель организации

генеральный директор  
(должность)

  
(личная подпись)


А.А. Ишмухаметов  
(расшифровка подписи)

Приказ завизирован:  
Главный бухгалтер

  
(личная подпись)

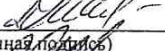
О.В. Колобаева

Руководитель научного направления  
учреждения

  
(личная подпись)


Е.А. Ткаченко

Начальник юридического отдела

  
(личная подпись)

А.Г. Кругликова

Начальник отдела кадров

  
(личная подпись)

А.И. Симакова



Специалист по  
персоналу 2 категории  
Бодрина Е. Н.



Подлинник документа находится в ОК  
ФГАНУ «ФНЦИРИП им. МП ЧУМАКОВАРАН»  
(Ивашуту помощника)