

ОТЗЫВ НА АВТОРЕФЕРАТ

диссертационной работы Простовой Марии Андреевны на тему «Структурно-функциональная характеристика апикального участка домена d репликативного элемента *oriL* генома полиовируса», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Полиовирус является этиологическим агентом полиомиелита, и, таким образом, представляет значительный интерес для здравоохранения. Известно, что энтеровирусы, представителем которых является вирус полиомиелита, характеризуются высокой скоростью изменения генома, что ставит проблему сохранения функциональности его элементов. В цикле репродукции вируса полиомиелита ключевую роль играют РНК-белковые взаимодействия, что делает этот вирус удобной моделью для изучения РНК-белкового узнавания. Расшифровка молекулярных механизмов ключевых событий репликации вируса полиомиелита позволит приблизиться к пониманию механизмов помехоустойчивости подобных вирусов, а также принципов РНК-белкового узнавания в целом. Таким образом, тема исследования Простовой М.А. представляется весьма актуальной.

В своей диссертационной работе Простова М.А. наглядно демонстрирует, что для репликации вируса полиомиелита в апикальном участке домена d репликативного элемента *oriL* необходимо наличие определенной пространственной структуры, которая может быть реализована большим количеством последовательностей. Автор получил множество полногеномных конструкций, различающихся последовательностями в апикальном участке домена d репликативного элемента *oriL*. Была проверена эффективность репродукции таких геномов с помощью оценки бляшечных фенотипов. Таким образом выявлен спектр разрешенных последовательностей в данном участке генома полиовируса. Эти последовательности относятся к структурному классу UNCG. Далее Простовой М.А. было показано, что тетрапетли в апикальном участке домена d, принадлежащие к данному структурному классу, обеспечивают взаимодействие репликативного элемента *oriL* с вирусным белком 3CD и поддерживают эффективную репликацию вируса полиомиелита. Полученные данные позволяют автору заключить, что для полиовируса принцип узнавания пространственной структуры РНК-элемента, а не его последовательности, может быть дополнительным преимуществом, позволяющим сохранять функциональность генома при значительной скорости появления мутаций.

Следует отметить, что работа Простовой М.А. выполнена с применением самых современных методов молекулярной биологии. Формулировка цели, постановка задач, подбор методов исследования, интерпретация результатов и выводы свидетельствуют о высокой компетенции автора. Автореферат написан четко и ясно, отлично иллюстрирован.

В качестве замечаний можно отметить следующее:

- 1) для облегчения восприятия представленного в автореферате материала представляется целесообразным упомянуть о функциях белка 3С, а не только 3 CD;
- 2) подписи к Рисунку 4 могли бы быть более развернутыми, включать описания данных, представленных в секциях А, Б, В, Г, Д, Е, Ж;
- 3) в тексте автореферата присутствует некоторое количество опечаток.

Однако вышеуказанные замечания ни в коей мере не снижают научно-практическую значимость результатов проведенного исследования.

Суммируя все вышесказанное, можно утверждать, что работа Простовой Марии Андреевны на тему «Структурно функциональная характеристика апикального участка домена d репликативного элемента *oriL* генома полиовируса» выполнена на высоком методическом уровне, полученные результаты имеют фундаментальную и прикладную ценность. Таким образом, работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. N 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, что позволяет рекомендовать Простову М.А. к присуждению ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

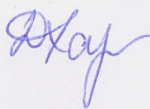
Кандидат биологических наук,
специальность 03.01.04 – биохимия,

научный сотрудник лаборатории геной инженерии

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

E-mail: harlampieva_d@mail.ru

Телефон: +7 (499) 246-46-65



Харлампиева Дарья Дмитриевна

Федеральное государственное бюджетное учреждение «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства», Россия, Москва, 119435, Малая Пироговская, д. 1а.

Подпись Харлампиевой Д.Д. заверяю:

Ученый секретарь

ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России,

к.б.н.



Васильева Людмила Львовна

20.11.2017

ОТЗЫВ

Тимофеевой Татьяны Анатольевны

на автореферат диссертации Простовой Марии Андреевны «Структурно-функциональная характеристика апикального участка домена d репликативного элемента *oriL* генома полиовируса» на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.02.02 - вирусология».

Полиовирус (или вирус полиомиелита), относящийся к семейству Picornaviridae роду Enterovirus, является возбудителем опасного острого инфекционного заболевания с поражением ЦНС, главным образом серого вещества спинного мозга. Поскольку проблема полиомиелита является одной из актуальнейших медицинских проблем, в решении которой важное значение имеет разработка эффективных профилактических средств, ценность работы Марии Андреевны Простовой не вызывает никаких сомнений. Результаты данного исследования могут найти применения в рациональном дизайне потенциальных ингибиторов вирусной репликации.

Важный аспект проведения фундаментальных исследований механизмов репликации вирусов заключается в том, что такие исследования имеют общебиологическое значение, поскольку расширяют наши познания в области молекулярной вирусологии и совершенствуют представление о молекулярных механизмах, лежащих в основе патогенеза вирусных заболеваний. Автором убедительно показано, что для полиовируса принцип узнавания пространственной структуры РНК-элемента, а не его последовательности, может служить дополнительным преимуществом, позволяющим сохранять функциональность генома при высокой скорости появления мутаций.

Результаты диссертационной работы доложены на представительных международных конференциях и отражены в 8 публикациях (в том числе 3 статьи в журналах, индексируемых в международных системах цитирования – Web of Science, Scopus). Достоверность представленных в автореферате диссертации результатов, а также обоснованность выводов не вызывают сомнений.

Заголовок и общая характеристика работы, представленные в автореферате вполне информативны. Результаты исследования изложены логично, доступно, со ссылками на иллюстративные материалы (рисунки и таблицы). Автореферат в целом хорошо структурирован, легко читается. На мой взгляд, Простова Мария Андреевна заслуживает присуждения ей искомой степени по специальности 03.02.02 – «вирусология».

Руководитель лаборатории физиологии вирусов ФГБУ «Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи» Минздрава России,

кандидат биологических наук

Тимофеева Татьяна Анатольевна.

Подпись руководителя лаборатории физиологии вирусов в.н.с. Тимофеевой Т.А. заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи» Минздрава РФ,

кандидат биологических наук



Л.К. Кожевникова

ОТЗЫВ

На автореферат диссертационной работы Простовой Марии Андреевны на тему «Структурно-функциональная характеристика апикального участка домена d репликативного элемента oriL генома полиовируса», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология

Полиовирус, как этиологический агент полиомиелита и модельный представитель рода энтеровирусов, представляет практический интерес для здравоохранения. Несмотря на значительные успехи в исследовании молекулярных аспектов цикла репродукции этого вируса, ряд ключевых событий репликации его генома до сих пор остаются не расшифрованными. Между тем, знание о молекулярных механизмах ключевых событий репликации этого энтеровируса может быть использовано в создании новых вакцин и поиске потенциальных ингибиторов вирусной репликации не только против самого полиовируса, что, несмотря на успехи программы ликвидации паралитического полиомиелита, является актуальным, но и в отношении других патогенных энтеровирусов.

В работе с использованием различных методов показано, что для эффективного узнавания вирусным белком 3CD в апикальном участке домена d репликативного элемента oriL должна присутствовать тетрапетля пространственного структурного класса UNCG. Причем убедительно доказано, что первичная последовательность апикального участка практически не играет роли в узнавании до тех пор, пока формируется необходимая пространственная структура. Для характеристики спектра возможных нуклеотидных последовательностей было создано более двух десятков генно-инженерных конструкций, содержащих полные геномы вируса полиомиелита с различными мутациями в исследуемых участках. Анализ широкого набора вариантов позволил сформулировать два разных консенсуса тетрапетель, которые находясь в апикальном участке домена d, способны поддерживать репродукцию вируса: nYNHGm (но не gCUUGc) и uGVUAg, где n и m – любые комплементарные нуклеотиды, Н – любой нуклеотид, кроме G и V – любой нуклеотид, кроме U. Полученные результаты были сравнены с разнообразием последовательностей этого участка у всех найденных на момент исследования в базе данных NCBI природных изолятов вирусов вида Enterovirus C. Для прямого анализа эффективности связывания вирусного белка 3CD и различных мутантных oriL была получена новая генно-инженерная конструкция, экспрессирующая рекомбинантный белок 3CD в клетках *E.coli*, и разработана методика его наработки и очистки. Полученные

результаты также вносят вклад в понимание природы РНК-белкового взаимодействия в целом. Работа представляет собой законченное многогранное исследование, с достаточной экспериментальной базой. Результаты описаны понятным языком, выводы соответствуют результатам. Основные результаты исследования опубликованы в ведущих мировых научных журналах – *RNA biology*, *Eurosurveillance*, *PeerJ*.

В качестве замечания следует отметить, что не вся информация, представленная в таблицах и рисунках автореферата, имеет описание в тексте. Однако это не умаляет достоинств работы.

Суммируя все вышесказанное, можно утверждать, что работа Простовой Марии Андреевны на тему «Структурно-функциональная характеристика апикального участка домена d репликативного элемента oriL генома полиовируса» выполнена на высоком методическом уровне, полученные результаты имеют фундаментальную и прикладную ценность. Таким образом, работа соответствует требованиям п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. N 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, что позволяет рекомендовать М.П. Простову к присуждению ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Файзулов Евгений Бахтиерович,

13.11.2017г.

кандидат биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной вирусологии
Федеральное государственное бюджетное научное учреждение

«Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова»

105064, Москва, Малый Казенный переулок, д.5а

Тел +7 (495) 674-45-84

E-mail: faizuloev@mail.ru

Подпись Е.Б. Файзулоева заверяю.

Зам. директора НИИ ВС им. И.И. Мечникова, г.б.н., профессор (Н.В. Ямникова)



ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы Простовой Марии Андреевны «Структурно-функциональная характеристика апикального участка домена d репликативного элемента oriL генома полиовируса», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - «вирусология».

Вирус полиомиелита является представителем рода *Enterovirus* и относится к семейству *Picornaviridae*. Многие пикорновирусы являются важными патогенами человека и животных и могут вызывать заболевания центральной нервной системы, сердца, печени, дыхательных путей, пищеварительной системы. Особенностью РНК-вирусов, в том числе и пикорновирусов, является высокая изменчивость их генома за счет большей частоты ошибок РНК-зависимой РНК-полимеразы по сравнению с ДНК-полимеразами, что создает разные фенотипические варианты и позволяет вирусу быстро мутировать и адаптироваться. В связи с этим недавние вспышки полиомиелита, в том числе и в ближнем зарубежье, свидетельствуют о медицинской значимости изучения полиовируса. В фундаментальном плане полиовирус является одним из наиболее хорошо изученных представителем безоболочечных вирусов, на модели которого изучены многие аспекты биологии РНК-вирусов, в частности РНК-белковые взаимодействия в жизненном цикле вируса. В ходе репликации полиовируса образуются три основных рибонуклеопротеидных комплекса, осуществляющих регуляцию этапов репликации. Деталю взаимодействия вирусного белка 3CD и репликативного РНК-элемента вирусного генома, oriL, посвящена диссертационная работа Простовой М.А.

Автором проделана большая и кропотливая работа по выявлению нуклеотидных последовательностей в апикальном участке домена d репликативного элемента oriL, влияющих на репродукцию вируса полиомиелита. В том числе автором методом обратной генетики созданы и охарактеризованы варианты полиовируса с разными нуклеотидными последовательностями в апикальном участке домена d oriL. Также диссертантом получен рекомбинантный вирусный белок 3CD и исследованы взаимодействия различных последовательностей oriL с 3CD *in vitro*.

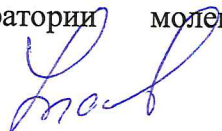
На основании результатов исследований, представленных в работе, возникает несколько вопросов. 1) Каким образом мутация Thr154Ile компенсирует нарушение структуры апикального участка домена d репликативного элемента oriL? 2) В ряде изолятов были идентифицированы замены во фланкирующих позициях тетрапетли для восстановления репликативной способности вируса. Как автор объясняет механизм "работы" этих мутаций? 3) Может ли автор предположить, с чем связан запрет на U в четвертой позиции тетрапетли в исследованном октануклеотиде?

В тексте реферата есть небольшое количество опечаток и неточностей, не умаляющих достоинства работы и, по-видимому, свидетельствующие о некоторой спешке. Так, на стр. 11. написано «ориентация» и «относительно», на стр. 17 – «ревертатнт». На стр. 12 наречие «наполовину» написано отдельно. На стр. 19 «неденатурирующий» написано отдельно. На стр. 8 автор пишет о корреляции частот встречаемости нуклеотидов в экспериментально отобранных последовательностях с частотой соответствующих нуклеотидных остатков в этих положениях в плазмидных клонах, но при этом не приводит коэффициентов корреляции. Также на стр. 18 и стр. 20 не приведены коэффициенты корреляции, подтверждающие соответствующие утверждения. Еще одно минорное вкусовое замечание – это употребление англицизма «фитнес» на стр. 21 при наличии устоявшегося эквивалентного термина «способность к репликации».

Несмотря на сделанные небольшие замечания, все изложенное позволяет сделать заключение о том, что работа Простовой М.А. «Структурно-функциональная характеристика апикального участка домена d репликативного элемента oriL генома полиовируса» является законченным научным трудом, в котором выявлен принцип

узнавания репликативного РНК-элемента *oriL* полиовируса посредством распознавания его пространственной структуры, которая может быть закодирована набором различных последовательностей, что приспособливает полиовирус к мутациям в ключевых функциональных элементах генома. Работа полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор несомненно заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - «вирусология».

Старший научный сотрудник лаборатории молекулярной генетики
внутриклеточного транспорта ИБГ РАН, к.б.н. А.В. Уласов



22.11.2017

