

Федеральное государственное бюджетное  
учреждение науки

**Институт  
биологии развития  
им. Н.К. Кольцова РАН  
(ИБР РАН)**

ул. Вавилова, д. 26, Москва, 119334  
Тел. 8 (499)-135-33-22 Факс 8 (499)-135-80-12  
E-mail: idbras@bk.ru  
http://idbras.comcor.ru/  
ОКПО 02699062, ОГРН 1027700450800  
ИНН/КПП 7736044850/773601001

05.05.16 № 12506-02/171(а)

**«У Т В Е Р Ж Д А Ю»**

**Директор**

**Федерального государственного  
бюджетного учреждения науки  
Института биологии развития  
им. Н.К. Кольцова (ИБР РАН)**



Д.б.н., проф. А.В. Васильев

На № \_\_\_\_\_ от \_\_\_\_\_

« \_\_\_\_\_ » 2016 г.

**Отзыв ведущей организации  
о научно-практической значимости диссертации  
Козлова Евгения Николаевича  
на тему: «АНАЛИЗ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ КАПСИДНЫХ БЕЛКОВ  
ДЕНСОВИРУСА РЫЖЕГО ТАРАКАНА (BgDv1) В ГЕТЕРОЛОГИЧНЫХ  
СИСТЕМАХ – КУЛЬТУРАХ КЛЕТОК МЛЕКОПИТАЮЩИХ И  
ТРАНСГЕННЫХ ЛИНИЯХ ДРОЗОФИЛЫ», представленной к защите на  
соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности:  
03.02.07 – «Генетика»**

#### **АКТУАЛЬНОСТЬ ТЕМЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Тема работы Козлова Е.Н. посвящена двум главным вопросам: 1. Можно ли проводить исследования экспрессии денсовирусных белков в гетерологических системах и 2. Имеют ли предсказанные сигналы ядерной локализации и ядерного экспорта функциональное значение для ядерно-цитоплазматического трафика капсидных белков денсовируса рыжего таракана. Денсовирусы являются подсемейством семейства парвовирусов. Денсовирусы поражают хозяйственно ценные виды тутового шелкопряда и креветок, а также насекомых-вредителей сельского хозяйства и насекомых-переносчиков тяжелых заболеваний человека (энцефалиты,

тропические лихорадки). В силу малых размеров денсовирусы могут использоваться в качестве эффективных векторов при получении генетически модифицированных насекомых для нужд медицины и сельского хозяйства. Тем не менее, биология денсовирусов остаётся слабоизученной и остро нуждается в интенсивном исследовании. В частности то, как происходит внутриклеточный трафик капсидных белков денсовирусов, и к каким последствиям он приводит в организме хозяина, до сих пор остаётся не решённой проблемой. Таким образом, данная диссертационная работа посвящена актуальному направлению исследования. На наш взгляд попытка диссертанта использовать культуры клеток млекопитающих и плодовую муху *D. melanogaster*, насекомое, не являющееся хозяином для денсовируса BgDv1, поражающего рыжего таракана, является достаточно смелым решением. Тем не менее, этот подход оправдан для исследования функциональных характеристик вирусных белков и отдельных белковых мотивов. К тому же такой подход может способствовать открытию новых, эволюционно сложившихся генетически-запрограммированных видоспецифических механизмов сопротивления организмов вирусным инфекциям.

Актуальность темы исследования не вызывает сомнений.

## **НОВИЗНА НАУЧНЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ**

На наш взгляд основной научной новизной работы Козлова Е.Н. является разработка новой стратегии для изучения функционирования денсовирусных белков, которая предполагает использование гетерологических систем. Используя культуры клеток млекопитающих, автор достоверно показал функциональную значимость предсказанных сайтов ядерного трафика капсидных белков исследуемого денсовируса. Используя широкие возможности модельного организма *D. melanogaster* для исследования судьбы капсидных белков в клетке, Козлов Е.Н. обнаружил интересный феномен – активацию сплайс-сайтов в молекуле мРНК, кодирующей вирусный белок, сопровождаемую изменением активности генов, ответственных за врожденный иммунный ответ.

## **ПРАКТИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ**

Практическую ценность результатов исследования Козлова Е.Н. определяет объект исследования – денсовирус беспозвоночных животных, избирательно

поражающий, как вредных для человека насекомых (тараканы, комары), так и разводимых в промышленном масштабе креветок и тутового шелкопряда. Практическую значимость работы также заключается в демонстрации возможности использования хорошо отлаженных модельных гетерологических систем в научных целях, облегчающих исследование функциональных мотивов вирусных белков и их искусственных модификаций. Наконец, результаты работы Козлова Е.Н. можно приводить студентам при чтении специализированных курсов лекций по генной инженерии и вирусологии.

## **ОЦЕНКА СОДЕРЖАНИЯ ДИССЕРТАЦИИ**

Сама диссертация состоит из стандартных разделов: «Введения», «Обзора литературы», «Материалов и методов исследования», «Результатов и Обсуждения», «Выводов» и «Списка использованной литературы». В конце диссертации имеются два «Приложения». Работа изложена на 105 страницах текста, иллюстрирована 17 рисунками и 1 таблицей. Список цитируемой литературы включает 286 источника. Основные результаты диссертации опубликованы в рецензируемых российских журналах и тезисах международных конференций и семинаров. Автореферат полностью отражает содержание диссертации.

Во Введении автор лаконично обосновывает актуальность выбранной темы и формулирует цель и задачи исследования, выделяет научную новизну, практическую ценность, степень достоверности и апробацию результатов работы, даёт сведения о публикациях и выступлениях на научных форумах. Цель исследования и задачи сформулированы корректно.

Обзор литературы состоит из 8-ми разделов, в которых автор даёт характеристику парвовирусам, подробно описывает внутриклеточный трафик парвовирусов, затрагивает проблематику исследования транспорта вирусных белков через ядерный поровый комплекс. Отдельные главы посвящены модельному объекту дрозофиле и характеристике сигнальных путей, активирующих её врожденный иммунитет. Глава «Обзор литературы» снабжена цветными рисунками и схемами, производит целостное впечатление и полностью соответствует названию и тематике диссертации.

В работе Козлов Е.Н. использовал широкий арсенал классических и новейших методик в области молекулярной генетики. В главе «Материалы и методы» представлены подробные протоколы молекулярного клонирования, создания генетических конструкций и получения трансгенных линий *D. melanogaster*, Вестерн-

блот анализа, ОТ-ПЦР с детекцией результатов в режиме реального времени, секвенирования нового поколения (NGS). Описано поддержание культур клеток млекопитающих и их иммуногистохимическое окрашивание. Исследования проводились на сертифицированных и откалиброванных приборах. Перечислены статистические критерии, используемые для анализа полученных результатов. Это дает основание считать полученные данные достоверными. Используемые методы характеризуют автора как экспериментатора высокой квалификации в области генетики.

Достоинством экспериментальной части представленной к защите работы является безупречная логика, последовательность, тщательность проведения опытов и критичность оценки полученных результатов. Экспериментальную работу Козлов Е.Н. начинает с исследования внутриклеточной локализации созданных им гибридных, слитых с GFP, капсидных белков BgDV1 (VP1, VP2 и VP3) в пересеваемых культурах клеток человека HeLa и зелёной мартышки Cos1. Эти эксперименты позволяют автору сделать обоснованный вывод о возможности использования культур клеток человека в качестве модельной системы при исследовании трафика денсовирусных белков. Модифицируя предполагаемые сайты ядерно-цитоплазматического трафика NLS и NES, диссертант доказывает их функциональную значимость. Исследование капсидных белков с использованием трансгенных дрозофил принципиально отличается от такового на культуре клеток, где плазмидные конструкции попадают сначала в цитоплазму и экспрессируются независимо от генома хозяина. В экспериментах на дрозофиле трансгенные конструкции, кодирующие кДНК капсидных белков, были встроены в хозяйский геном с помощью оригинальной методики по механизму сайт-специфической рекомбинации AttP-AttB. Затем их экспрессию активировали с использованием дрожжевой двухкомпонентной системы UAS/GAL4. Результатом этих экспериментов стало открытие необычного феномена: активизации ранее не активных сайтов сплайсинга при созревании мРНК капсидных белков денсовируса. Козлов Е.Н. делает предположение о существовании неизвестной ранее системы защиты от потенциально опасных вирусных белков у *D. melanogaster*. В заключительной серии экспериментов Козлов Е.Н. произвёл широкомасштабный биоинформационный сравнительный анализ транскриптомов трансгенных дрозофил двух линий, отличающихся по интегрированным копиям гена, кодирующего капсидный белок VP2: с нормальным сигналом ядерной локализации и без него. Результаты этих экспериментов позволили автору продемонстрировать не только регуляторную роль капсидных белков вирусов в

контроле генной активности организма-хозяина, но и принципиальную разницу активируемых групп генов. Козлов Е.Н. обнаружил, что у дрозофил с преимущественно цитоплазматической локализацией модифицированного белка VP2\_E происходит активация генов врождённого иммунитета, в случае же экспрессии нативного белка VP2, способного проникать в ядро, происходит активация транскрипции группы генов, участвующих в делении клеток. Экспериментальный материал хорошо документирован и иллюстрирован.

Тем не менее, диссертация Козлов Е.Н. содержит ряд погрешностей, на которые хотелось бы обратить внимание автора.

1. На рис. 8 перепутаны столбцы «А» и «Б» в ряду «VP2» – окрашивание антителами специфичными к N-концевой части гибридного белка.

2. Если сравнивать фракции «d» и «a» на рис. 12А, следуя за автором, то утверждение «количество сплайс-варианта, у которого вырезаны оба интрона, по отношению к несплайсированной форме РНК составляет 0,48» (стр. 72) кажется сомнительным. Очевидно, имелось в виду отношение не «d» к «a», а обратное - «a» к «d».

3. На наш взгляд эксперименту, результат которого представлен на рис. 17 (результат ПЦР в реальном времени кДНК генов секропина, диптерицина и дрозомидина), не хватает контрольных образцов, где бы экспрессия мРНК тестируемых генов измерялась в линиях с неактивированными конструкциями. Кроме того, судя по доверительным интервалам, различия в экспрессии гена дрозомидина у дрозофил тестируемых линий кажется сомнительной (последние столбики, рис. 17).

4. Неправильно указаны страницы статьи №6 в списке публикаций по теме диссертации: с. 435 – 477. Нужно с. 435 – 447

5. Наконец, несмотря на то, что обсуждение результатов идёт по мере их получения в главе «Результаты и обсуждение», на наш взгляд диссертации не хватает отдельной главы «Заключение», обобщающей результаты работы в целом, и сравнивающей их с известными работами в данной области.

Перечисленные замечания, однако, относятся исключительно к оформлению выполненной работы и не снижают её общей ценности.

По диссертационной работе к автору есть несколько вопросов.

1. При постановке экспериментов на культуре клеток происходит нехромосомная репликация плазмиды с образованием большого числа ее копий в цитоплазме клеток. Это приводит к внутриклеточному образованию рекомбинантных белков в больших количествах. Учитывая факт того, что экспрессия плазмиды в цитоплазме идёт постоянно, чем объяснить присутствие гибридных белков исключительно в ядре и отсутствие в цитоплазме наработанных де ново белковых

молекул на рис. 7 для VP1, VP2 и VP2\_m? Ведь на рис. 8, где применялось окрашивание антителами к GFP, в отличие от рис. 7, где применялось окрашивание антителами, специфичными к N-концевой части гибридного белка, мы видим следовые количества белков капсида в цитоплазме. Можно ли это объяснить присутствием аномального сплайсинга, отщепляющего фрагмент, кодирующий GFP? Или это связано с различными условиями эксперимента (время инкубирования, и т.п.), или специфичностью антител?

2. Как вы полагаете, можно ли объяснить отсутствие активации скрытых сплайс-сайтов мРНК капсидных белков денсовируса при инфицировании рыжего таракана наличием у денсовируса генов *NS*, продукты которых, возможно, играют регуляторную роль в этом процессе, защищая мРНК капсидов от аномального альтернативного сплайсинга, наблюдаемого у дрозофилы?

В целом, диссертационная работа Козлова Е.Н. представляет собой законченный научно-исследовательский труд. Она выполнена на высоком методическом уровне. Полученные результаты отражены в 5-ти выводах и полностью соответствуют поставленным целям и задачам исследования.

Результаты диссертационной работы Козлова Е.Н. могут быть использованы в различных учреждениях молекулярно-биологического и генетического профиля, таких как Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной генетики РАН, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт цитологии и генетики СО РАН, кафедры биологического факультета Московского, Санкт-Петербургского, Новосибирского и Томского Государственных университетов, и во многих других научных и прикладных учреждениях, исследующих особенности экспрессии и функционирования вирусных белков и эволюцию механизмов сопротивления вирусным инфекциям.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертационная работа Козлова Е.Н. «Анализ экспрессии генов капсидных белков денсовируса рыжего таракана (*BgDV1*) в гетерологичных системах – культурах клеток млекопитающих и трансгенных линиях дрозофилы», выполненная

под руководством д.б.н., профессора Мухи Д.В., является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научно-методологическом уровне с использованием современных молекулярно-генетических методов исследования. Результаты, приведённые в работе, представляют высокую значимость для понимания механизмов экспрессии вирусных белков и видоспецифического сопротивления организма хозяина вирусной инфекции. Диссертационная работа Козлова Е.Н. по содержанию, актуальности, новизне, научному и методическому уровню, практической ценности полученных результатов полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и может быть рекомендован к защите в специализированном совете по специальности 03.02.07 – «Генетика», а ее автор заслуживает присуждения искомой степени.

Отзыв на диссертационную работу Козлова Е.Н. заслушан, обсуждён, одобрен и утверждён на заседании Учёного совета Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН по специальности 03.02.07 – генетика, 27 апреля 2016 г. (Протокол № 5 от 27.04.2016 г.).

Зав. лаб. регуляции морфогенеза  
ИБР РАН  
К.б.н.

Симонова О. Б.

Подпись Симоновой О.Б. заверяю

Ученый секретарь  
ИБР РАН  
К.б.н.



Хабарова М. Ю.

Сведения о составителе отзыва:  
Симонова Ольга Борисовна, кандидат биологических наук,  
заведующая лабораторией регуляции морфогенеза  
Федерального государственного бюджетного учреждения  
науки Института биологии развития им. Н.К. Кольцова  
(ИБР РАН)  
Адрес: 119334, Москва, ул. Вавилова 26.  
e-mail: osimonova@hotmail.com