

ОТЗЫВ

ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Козлова Е.Н. «Анализ экспрессии генов капсидных белков денсовируса рыжего таракана (BgDV1) в гетерологичных системах – культурах клеток млекопитающих и трансгенных линиях дрозофилы», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности:

03.02.07 - Генетика.

Кандидатская диссертация Е.Н. Козлова посвящена изучению механизмов внутриклеточной локализации капсидных белков BgDV1 и особенностей их экспрессии в гетерологичных системах. Объектом исследования диссертационной работы являлся денсовирус рыжего таракана (BgDV1), относящийся к семейству Parvoviridae. С небольшого по размерам генома транскрибируется шесть мРНК, кодирующие три неструктурных и три структурных белков (VP1, VP2 и VP3). При этом о самих белках известно довольно мало. В проделанной работе Козловым была изучена внутриклеточная локализация капсидных белков BgDV1 (VP1, VP2 и VP3) в пересеваемых культурах клеток млекопитающих (HeLa и Cos1), и показана для них функциональная значимость сигналов ядерного транспорта (NLS и NES). На полученных трансгенных линиях дрозофил были исследованы как особенности экспрессии нативных и мутантных вариантов кДНК вирусных капсидных белков, так и проведен полнотраскриптомный анализ дифференциальной экспрессии генов.

Известно, что капсиды парвовирусов формируются за счет самосборки капсидных белков, процесс который во многом остается непонятым. Поэтому такое детальное исследование капсидных белков в полной мере отражает актуальность избранной темы. При этом объект исследования (денсовирус рыжего таракана), относится к семейству Parvoviridae, из которого большая часть является возбудителями опасных заболеваний человека, сельскохозяйственных и домашних животных. Культуры клеток или трансгенные животные, инфицированные денсовирусами и экспрессирующие на определенной стадии развития конкретные вирусные белки, могут рассматриваться в качестве удобной модели для изучения особенностей патогенеза. Также определенные виды денсовирусов могут рассматриваться в качестве эффективных биологических агентов для борьбы с вредными для человека насекомыми.

С учетом сказанного выше, диссертационная работа Козлова Е.Н. представляется современной и, несомненно, актуальной.

Композиция диссертации традиционна. Ее текст изложен на 105 страницах машинописного текста, включающих в себя: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, главу с изложением и обсуждением собственных результатов, выводы и приложение. Список литературы включает 144 зарубежных и 4 отечественных источников. Диссертация иллюстрирована 3 таблицами и 17 рисунками.

Во введении вполне убедительно обосновывается актуальность исследования, четко сформулированы цель и задачи, которые охватывают различные аспекты работы.

В главе обзор литературы изложены как общие характеристики парвовирусов, так и их особенности функционирования, такие как сплайсинг вирусных мРНК, внутриклеточный трафик вирусных частиц, транспорт вирусных белков. Обзор написан очень хорошо, читается легко и понятно. Все раскрытые темы используются автором при постановке задачи, а также при обсуждении полученных результатов. В качестве замечания хочется сказать, что при детальном описании подсемейства *Densovirinae*, было бы хорошо также привести филогенетический анализ всех рассмотренных вирусов. Данный анализ был бы не только хорошей характеристикой разнообразия вирусов, но и удобным вариантом их каталогизации.

Далее автор приводит характеристику материалов и методов исследования, используемых в работе. Не смотря на применение широкого спектра разных молекулярно-генетических методов, описаны они не так подробно, как хотелось бы. Так для сайт-направленного мутагенеза описан лишь основной принцип, но не сама методика. Описание метода «ПЦР в реальном времени» не дает понимания того, какая флуоресцентная система использовалась для детекции сигнала, как обрабатывались данные, как вообще проходил данный этап. В качестве отдельного замечания хочется отметить, что использование алкогольдегидрогеназы, в качестве референсного гена, не является правильным. Так как зачастую этот ген имеет большое количество псевдогенов, а также не очень стабильно экспрессируется. В любом случае, для получения достоверных данных необходимо использовать несколько референсных генов.

В отличии обзора литературы, раздел «Результаты и обсуждение» написан не так широко и полно, как ожидалось. Какие-то моменты о том, как выполнялись те или иные исследования, необходимо было написать подробнее, или раскрыть их в разделе «материалы и методы». Также стоит отметить, что в этой главе приведено совсем немного иллюстративного материала, демонстрирующего этапы работы: три рисунка с локализации

ей белков, и две электрофореграммы. При этом сделан довольно приличный объем работы, который автор почему-то решил не вставлять в диссертацию, по-видимому, оценив это как технические моменты, которые нет необходимости освещать.

Также при чтении раздела «Результаты и обсуждение» возникли вопросы, ответы на которые не были найдены в тексте диссертации:

1. Одним из первых экспериментов автор определил внутриклеточную локализацию изучаемых капсидных белков. Однако, учитывая, что они исследуются впервые, было бы правильно вначале подтвердить их экспрессию классическим Western блотом.
2. При проведении секвенирования транскриптома, автором было получено несколько десятков миллионов ридов. При этом совсем не понятно, сколько из них пришлось на сами вирусные транскрипты. В зависимости от их числа, можно было с уверенностью обсуждать – все ли изоформы были идентифицированы, с какой точностью были определены соотношения по экспрессии между ними.
3. Совсем немного информации приведено по анализу уровня экспрессии с помощью ПЦР в реальном времени. На рисунке указаны доверительные интервалы, но не понятно на чем они базируются? Сколько биологических повторностей было использовано в эксперименте?
4. Анализ вирусных РНК автор демонстрирует на самой нуклеотидной последовательности, отмечая на ней цветами и различными шрифтами границы интронов и разных изоформ. Это не удобный формат представления данных для обсуждения. Лучше всего воспользоваться классическим отображением альтернативных транскриптов в виде схематических блоков соединенных интронными линиями. Такой формат понятен сходу любому читателю.

В целом данная работа представляется интересной, современной и высоко актуальной. Написана она хорошо и легко читается. Автореферат диссертации и публикации по ней полностью отражают научную новизну и содержание работы.

Заключение.

Представленная диссертационная работа Козлова Е.Н. на тему «Анализ экспрессии генов капсидных белков денсовируса рыжего таракана (BgDV1) в гетерологичных

системах – культурах клеток млекопитающих и трансгенных линиях дрозофилы» является законченным научным исследованием, имеет существенное научное и практическое значение и полностью соответствует требованиям ВАК РФ, предъявляемым к кандидатским диссертациям, и п. 9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», а ее автор, Евгений Николаевич Козлов, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

И.о. зав. лабораторией функциональной геномики

ФГБНУ «МГНЦ», кандидат биологических наук

Скоблов М.Ю.

05 мая 2015 г.

ФГБНУ Медико-генетический научный центр,

115478 Москва, ул. Москворечье, д.1, тел. (499) 612-98-89, mgnc@med-gen.ru

Подпись Скоблова М.Ю. заверяю

Ученый секретарь ФГБНУ «МГНЦ» Е.С. Воронина



Воронина Е.С