

ОТЗЫВ

о диссертационной работе

КОЗЛОВА ЕВГЕНИЯ НИКОЛАЕВИЧА «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 исследования.

Диссертация Е.Н.Козлова посвящена исследованию актуальной проблемы биологии – проблемы взаимодействия вирусного и хозяйского геномов. В этой связи, парвовирусы вызывают значительный интерес, поскольку представители одного из его двух подсемейств – *Parvovirinae* – являются возбудителями опасных заболеваний с высокой летальностью у человека и животных. Второе подсемейство парвовирусов – *Densovirinae*, представители которого инфицируют членистоногих, слабо изучено. Между тем, денсовирусы могут являться прекрасной моделью для исследования механизмов защиты от парвовирусов. Кроме того, глубокое понимание биологии денсовирусов позволит эффективнее бороться с заболеваниями хозяйственно ценных видов насекомых, а также использовать денсовирусы в качестве средства борьбы с различными вредными насекомыми.

Исследования в области денсовирусов до некоторой степени ограничены отсутствием адекватной модельной системы. Моделью для представленного Е.Н.Козловым исследования стал денсовирус рыжего таракана (BgDV1). Одним из подходов, позволяющих изучать взаимодействия капсидных белков *in vivo*, служит их гетерологичная экспрессия в клетках организмов, которые в норме не являются хозяевами для исследуемого вируса. Данный подход реализован в работе Е.Н.Козлова и позволяет изучать не только стандартные про- и противовирусные реакции, но также наблюдать за реакцией организма на вирусный белок, который в естественных условиях не мог бы попасть в клетки модельных систем.

Следует также отметить, что в последнее время появляется все больше новых данных, указывающих на возможность использования организмом механизмов, обеспечивающих его нормальную жизнедеятельность, для борьбы с инфекцией. Один из таких механизмов – сплайсинг вирусной РНК – изучен в представленной к защите диссертации. Всестороннее исследование этого защитного ресурса может позволить

выявить не только новые способы борьбы с вирусными инфекциями, но и решать широкий круг фундаментальных научных задач.

Научная новизна и значимость исследования.

В диссертационной работе Е.Н.Козлова впервые экспериментально показана возможность использования пересеваемых клеточных культур клеток млекопитающих для изучения внутриклеточного транспорта капсидных белков денсовируса, а также выявлена функциональная значимость сигналов ядерного транспорта капсидных белков BgDV1.

В работе получены уникальные трансгенные линии *Drosophila melanogaster*, которые использовались автором и могут быть использованы в дальнейшем для исследования влияния экспрессии последовательностей, кодирующих капсидные белки денсовируса в геноме дрозофилы, в том числе последовательностей с нарушенным сигналом ядерного транспорта.

Значительным достижением можно считать полученные в работе данные о том, что изменение внутриклеточной локализации капсидного белка денсовируса рыжего таракана в клетках трансгенных линий *D. melanogaster* влияет на транскрипцию генов организма-хозяина, вызывая изменение паттерна активностей генов врожденного иммунного ответа.

Структура диссертации. Достоверность и обоснованность научных результатов.

Диссертация построена по стандартному плану. Работа изложена на 103 страницах, включая 10 страниц Приложения, имеет 17 рисунков и таблицу. Раздел «Обзор литературы» представлен на 40 страницах, в нем детально описаны характеристика парвовирусов, систематика подсемейства Densovirinae, из которого более подробно рассмотрен денсовирус рыжего таракана (BgDV1); описан внутриклеточный трафик парвовирусов (включая взаимодействие вириона с рецептором клетки и его проникновение в клетки, транспорт через систему эндосом, проникновение в ядро); дана характеристика дрозофилы как модели для генетических исследований и охарактеризован врожденный иммунитет *D. melanogaster*. В работе цитируется 148 статей, что свидетельствует о глубокой проработке автором научной литературы по теме исследования.

Раздел «Материалы и методы» включает 17 пунктов и описывает применение как классических, так и современных методов генетики (секвенирование следующего поколения, методы генетической инженерии, ПЦР в реальном времени, иммуногистохимические методы, получение трансгенных линий *D. melanogaster*,

трансфекция клеток млекопитающих др.). Спектр применяемых методов свидетельствует о хорошей методической подготовке автора.

Раздел «Результаты и обсуждение» содержит 3 главы, посвященных исследованию внутриклеточной локализации капсидных белков денсовируса BgDV1, экспрессии генов капсидных белков VP2 и VP3 в трансгенных линиях *D. melanogaster* и транскриптомный анализ дифференциально экспрессирующихся генов в трансгенных дрозофилах с интегрированным в геном нормальным и мутантным чужеродным геном VP2. Характер постановки экспериментов и обсуждения их результатов однозначно характеризуют Е.Н.Козлова как высококвалифицированного специалиста в области генетики.

В целом, работа производит очень благоприятное впечатление: она сделана на высоком методическом уровне, написана хорошим литературным языком и практически не содержит опечаток. Существенных замечаний к работе не имеется. Но есть несколько вопросов, вызванных интересом к работе.

1. Согласно данным FlyBase экспрессия исследуемых генов иммунного ответа (*DptB*, *CecC*, *Drs*) зависит от возраста *D. melanogaster*. Было ли это учтено при постановке экспериментов по обратной транскрипции, совмещенной с ПЦР в реальном времени, и по секвенированию транскриптомов трансгенных мух?

2. Каков принцип выбора генов иммунного ответа для исследования экспрессии методом ПЦР в реальном времени? Почему выбрали гены путей Toll и Imd и не исследовали экспрессию генов пути Jak-STAT (по результатам секвенирования РНК, представленным в работе, экспрессия генов семейств *Tot* и *Att* также повышена)?

3. На стр. 78 написано: «было показано, что гены всех трех исследованных антимикробных пептидов значимо сильнее экспрессируются в потомках F₁, полученных от скрещивания трансгенных самок VP2_E, по сравнению с потомками от самок VP2 (Рисунок 17)». Однако на рис. 17 значения уровней экспрессии гена дрозомицина в линиях VP2 и VP2_E практически не отличаются, более того, «усы» ошибок (это SEM?) перекрываются. Почему так можно утверждать?

4. Что означают обозначения H1 и H2 в таблице: это повторы или уровни экспрессии в линиях VP2 и VP2_E?

5. Можно ли однозначно утверждать, что экспрессия вирусных последовательностей, кодирующих белок с нативным сигналом NLS, связана с ослаблением транскрипционной активности генов, ответственных за врожденный иммунный ответ *Drosophila* (вывод 4)? Может ли быть так, что экспрессия вирусных последовательностей, кодирующих белок с нарушенным сигналом NLS, обуславливает

усиление транскрипционной активности генов, ответственных за врожденный иммунный ответ *Drosophila*?

Содержание автореферата.

Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации.

Заключение о научно-практической ценности работы и соответствии её требованиям ВАК

Диссертация Е.Н.Козлова представляет собой научный труд, в котором решаются задачи, имеющее существенное значение для генетики, молекулярной биологии и вирусологии. В целом работа соответствует требованиям ВАК РФ и Постановления Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. N 842 «О порядке присуждения ученых степеней», предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор, Е.Н.Козлов, безусловно, заслуживает присуждения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – «генетика».

Нефедова Лидия Николаевна
д.б.н., доцент кафедры генетики

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова».
Москва, Ленинские горы 1, стр.12, Биологический факультет
Телефон 8(495) 939 42 53, e.mail: lidia_nefedova@mail.ru
25.04.2016



ПОДПИСЬ РУКИ
ЗАВЕРЯЮ

Нефедова Л. Н.

Документовед биологического факультета МГУ