

Отзыв

на автореферат диссертации Нефедьевой Марии Владимировны на тему «Характеристика рекомбинантного вируса африканской чумы свиней с делецией регулятора транскрипции A238L», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - Вирусология.

Диссертационная работа Нефедьевой Марии Владимировны «Характеристика рекомбинантного вируса африканской чумы свиней с делецией регулятора транскрипции A238L» посвящена изучению механизмов избегания иммунного ответа хозяина вирусом африканской чумы свиней посредством создания штамма вируса Волгоград/14с, нокаутного по гену *A238L*.

Актуальность представленного исследования определяется тем фактом, что до сих пор не разработано достаточно эффективной вакцины против АЧС, что, в частности, обусловлено сложностью и многокомпонентностью взаимодействий вирус-хозяин. Следовательно, для разработки рациональных стратегий создания вакцин необходимы более совершенные знания о том, как вирус взаимодействует с хозяином и моделирует его реакцию.

Диссертационная работа содержит результаты биоинформатического анализа генов АЧС, ответственных за регуляцию иммунных реакций, а также молекулярно биологический блок, посвященный конструированию рекомбинантного вируса и анализу его активности в клеточной линии COS-1. В работе получены результаты филогенетического анализа аминокислотных последовательностей семи генов от 17 вирусов, представленных в открытых базах данных, на основании которых сделаны выводы о возможном использовании этих белков в качестве маркеров эволюционных процессов. Для трех из семи белков был проведен анализ варибельности, в результате которого белок 5EL бы определен как

наиболее вариабельный. Далее были получены и проанализированы сиквенсы генов трех белков для 16 штаммов вирусов из Государственной коллекции микроорганизмов, вызывающих опасные, особо опасные, в том числе зооантропонозные и не встречающиеся на территории страны болезни животных, и была показана консервативность нуклеотидных последовательностей вирусов в соответствии с географическим регионом его распространения.

Далее с использованием стандартных процедур молекулярно-генетического клонирования была получена конструкция, необходимая для осуществления гомологичной рекомбинации и замены гена *A238L* на ген *EGFP* в геноме вируса АЧС штамма Волгоград/14с. Данная плаزمиды была использована для получения рекомбинантного вируса с делецией исследуемого гена. По характеристикам инфекционности и репликативной активности полученный штамм Волгоград/14с $\Delta A238L$ не отличался от материнского. Показано отличие в активации апоптоза в клетках, инфицированных рекомбинантным штаммом, в сравнении с родительским вирусом и интактными клетками.

Из недостатков работы можно отметить следующие:

1. Не прослеживается причинно-следственная связь выбора для анализа трех генов из семи первоначальных. Стоит обосновать редукцию числа анализируемых генов.

2. В п. 3.1.2. на Рисунке 3 представлены результаты электрофореза продуктов амплификации гена *DP71L* для анализируемых штаммов вируса АЧС, однако указано, что анализ проводился для 16 штаммов, но результат представлен только для 13 из них. Следовало показать результаты амплификации всех анализируемых штаммов.

3. Предлагается добавить обоснование выбора штамма вируса Волгоград/14с, отсутствующего в исходной выборке 16 анализируемых вирусов, для создания рекомбинантного вируса.

4. Проверка на отсутствие исходного вирусного штамма в суспензии рекомбинантного осуществлялась путем амплификации гена, который делегирован в рекомбинантном штамме. Однако подобный метод проверки - основанный на детекции отсутствия результата - является сомнительным, особенно в отсутствии повторностей. Предлагается провести проверку с использованием праймеров, фланкирующих делеционный участок генома (должна быть разница в длине амплифицируемого участка в рекомбинантном и родительском штаммах), а также пару праймеров, один из которых локализован на интактном участке генома рядом с местом делеции, а второй - на интегрированном гене *EGFP* (детекция на наличие амплификации с мутантного штамма и контроль правильности интеграции).

5. В пункте 3.2.8 приведены результаты количественного анализа активации апоптоза, однако отсутствует оценка достоверности полученных различий в значениях для разных исследуемых групп.

6. При полногеномном секвенировании полученного в работе рекомбинантного штамма Волгоград/14с ΔA238L идентичность с референсным штаммом Georgia 2007/1 (FR682468) составила 99%. Предлагается объяснить столь высокий показатель, находящийся на уровне ошибки секвенирования для прибора MiniION, а также доказать отсутствие возможной контаминации исходно выбранного штамма Волгоград/14с вируса референсным штаммом.

7. Отсутствуют функциональные тесты на подтверждение свойств гена *A238L* как модулирующего иммунный ответ.

Заключение.

Судя по автореферату, диссертация Нефедьевой Марии Владимировны представляет собой законченную работу, выполненную на высоком уровне, отвечающую требованиям, установленным п.9 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением № 842 Правительства

РФ от 24 сентября 2013 года, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а соискатель заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 - Вирусология.

Заведующий лабораторией
геномной инженерии МФТИ,
кандидат биологических наук



Павел Юрьевич Волчков

Федеральное государственное автономное
образовательное учреждение высшего образования
«Московский физико-технический институт
(национальный исследовательский университет)»
(МФТИ)

141701, Московская область,
г. Долгопрудный,
Институтский пер., 9.
+7 (495) 408-45-54
E-mail: info@mipt.ru



ПОДПИСЬ РУКИ
ЗАВЕРЯЮ:

ЗАВЕДУЮЩАЯ КАНЦЕЛЯРИЕЙ
АДМИНИСТРАТИВНОГО ОТДЕЛА
М.А. ГУСЕВА

М.А. Гусева

