

ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Путляева Егора Валерьевича **«Новый вирусный вектор на основе генома потексвируса для экспрессии целевых белков в растениях»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология».

Диссертационная работа Путляева Егора Валерьевича посвящена созданию нового высокоэффективного фитовирусного экспрессионного вектора на основе генома вируса мозаики алтернантеры (ВМальт) штамма MU, описанного ранее на кафедре вирусологии биологического факультета МГУ, изучению роли отдельных цис-регуляторных элементов генома ВМальт в определении эффективности экспрессии целевых белков (ЦБ). Работа продолжает цикл исследований кафедры вирусологии в области молекулярной вирусологии и биотехнологии потексвирусов и основана на многолетнем богатейшем и прочном научном и методическом фундаменте в этой области растительной вирусологии.

Актуальность темы диссертационной работы

Системы транзientной экспрессии целевых белков в растениях, основанные на использовании фитовирусных векторов, в последние годы привлекают внимание все большего числа исследователей в силу их таких хорошо известных преимуществ, как высокая эффективность, простота генетических манипуляций, экономичность, безопасность и т.д. Недавние разработки в области гликоинженерии растений открывают возможность «гуманизации» белков в растениях, т.е. получения сложных белков с характерными для клеток человека посттрансляционными модификациями, что значительно расширяет потенциал растений как «биофабрик» для продукции ЦБ.

К настоящему моменту создано множество различных векторных систем на основе вирусов растений, которые успешно используются как для получения пептидов и полипептидов в растениях, так и в фундаментальных исследованиях, в том числе для изучения механизмов экспрессии фитовирусных генов и репликации фитовирусов. В то же время, до сих пор отсутствуют четкие критерии выбора оптимальной векторной системы для экспрессии того или иного ЦБ, не достигнут «потолок» продукции ЦБ в растениях. Интересным является сравнение эффективности различных векторных систем для экспрессии одного и того же полипептида, а также изучение влияния отдельных цис-регуляторных элементов фитовирусного генома на уровень продукции ЦБ.

В этой связи не вызывает сомнений важность и актуальность предпринятого Е.В. Путляевым исследования, направленного на разработку оригинальной отечественной транзientной фитовирусной системы экспрессии на основе генома ВМальт. В задачи диссертации входило создание серии вирусных векторов на основе генома ВМальт-MU в соответствии с принципом деконструированного вектора, отличающихся числом копий субгеномного промотора, сравнительный анализ эффективности полученных векторов для наработки различных ЦБ в *Nicotiana benthamiana*, исследование влияния подавления транскрипционной активности одного из двух субгеномных промоторов на уровень продукции модельных ЦБ.

1. Достоверность и новизна результатов и выводов диссертационной работы

Работа выполнена на высоком современном экспериментальном уровне с привлечением широкого арсенала методов генетической инженерии, молекулярной биологии, растительной вирусологии, иммунологии. Результаты экспериментов в целом подробно документированы и подвергнуты статистической обработке. Результаты работы представлены на престижных научных конференциях в виде докладов и печатных тезисов.

В результате предпринятого достаточно трудоемкого и кропотливого исследования была впервые создана серия вирусных векторов на основе генома ВМАльт-МУ. Среди созданных в ходе работы векторов следует выделить оригинальный вектор AltMV-double, отличающийся новым подходом при конструировании, а именно наличием двух промоторов синтеза субгеномных РНК ВМАльт, расположенных перед геном целевого белка. В работе показано, что благодаря транскрипционной активности обоих промоторов вирусный вектор AltMV-double способен обеспечивать высокий уровень экспрессии целевого белка. Также в диссертационной работе описан эксперимент по успешному отключению транскрипционной активности субгеномного промотора 1 ВМАльт с помощью однонуклеотидной замены и впервые описана нуклеотидная последовательность 5'-концевых нетранслируемых последовательностей субгеномных РНК 1 и 3 ВМАльт, что является важным результатом для процесса описания данного вируса.

Выводы обоснованы и непосредственно вытекают из полученных результатов.

2. Ценность полученных в диссертационной работе результатов для науки и практики

Автором продемонстрирована принципиальная возможность усиления транзientной экспрессии ЦБ в растениях за счет дубликации контролирующего продукцию ЦБ субгеномного промотора. Осуществлено картирование 5'-концевых нетранслируемых областей субгеномных РНК 1 и 3 ВМАльт. Также важным для дальнейших исследований механизмов репликации ВМАльт является продемонстрированный в работе способ деактивации одного из субгеномных промоторов за счет введения однонуклеотидной замены.

Прикладное значение полученных результатов состоит, прежде всего, в создании вирусного вектора AltMV-double, обеспечивающего высокий уровень продукции

целевых белков в растениях *Nicotiana benthamiana*. Оригинальность и удобство конструкции вектора делают AltMV-double перспективным инструментом растительной биотехнологии. Также практическое применение могут найти созданные на основе ВМальт-MU системы продукции в растениях важных для медицины белков – растворимого фрагмента гемагглютинаина вируса гриппа А и человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора.

Содержание диссертации

Структура работы традиционна. Диссертация состоит из введения, основной части (3 раздела), заключения и выводов. Список литературы насчитывает 171 источник. Работа изложена на 145 страницах текста, иллюстрирована 2 таблицами и 33 рисунками.

Во введении Путляев Е.В. останавливается на актуальности и научной новизне темы диссертационной работы, характеризует объект и методы исследования, формулирует цели и задачи диссертации, приводит данные о практической ценности результатов, области их применения, апробации работы и списке публикаций по теме исследования.

Обзор литературы состоит из трех частей. Первая часть посвящена общей характеристике потексвирусов, главным образом на примере таких хорошо изученных представителей рода, как Х-вирус картофеля и вирус мозаики бамбука. Автор приводит данные о структуре генома и таксономии потексвирусов, кратко описывает процесс их репликации, излагает известные из литературы данные о функциях вирусных белков. В изложении этих сведений чувствуется эрудиция автора и его глубокая заинтересованность в целом ряде обсуждаемых проблем.

Более подробно Путляев Е.В. останавливается на структурных особенностях отдельных цис-регуляторных элементов потексвирусов, важных для регуляции репликации, транскрипции и трансляции вирусных РНК, ее инкапсидации вирусным белком оболочки. Знание нуклеотидных последовательностей, определяющих специфичность и границы этих участков, роли отдельных элементов вторичной

структуры 5-НТО и 3-НТО вирусной геномной РНК в этих процессах и в регуляции «дальних» РНК-РНК взаимодействий, очевидным образом необходимо как для детализации наших представлений о молекулярных механизмах репликации и транскрипции потексвирусов, так и для разработки подходов к рациональному дизайну фитовирусных экспрессионных систем. Таким образом, представляется полностью оправданным то особое внимание, которое автор уделил данному вопросу в своем обзоре.

Вторая часть обзора посвящена особенностям молекулярной биологии вируса мозаики альтернантеры и построена по сходному плану – общие сведения о биологии и таксономии вируса, структура генома ВМальт, кодируемые белки.

Третья часть посвящена собственно описанию различных типов экспрессионных фитовирусных векторов, основанных на потексвирусных геномных РНК. Здесь автор верно указывает на две основные стратегии дизайна и конструирования таких векторов (стратегия полного вектора и стратегия деконструированного вектора), прослеживает историю их создания – от первых трудоемких и низкоэффективных подходов основанных на получении *in vitro* экпированных транскриптов кДНК-копий генома вируса до современных систем, основанных на инфильтрации листьев растений культурой агробактерий, содержащих плазмиду с участком кДНК фитовирусного генома под контролем растительного промотора. Далее автор более подробно перечисляет конструкционные особенности различных типов векторов, сравнивает их достоинства и недостатки, приводит примеры их использования для получения как «свободных» ЦБ в клетках растений, так и различных химерных вирусоподобных частиц, несущих в составе БО потексвируса различные чужеродные эпитопы.

Завершает обзор раздел, посвященный попыткам создания векторов на основе ВМальт. Как убедительно показывает Е.В. Путляев, эти вектора достаточно громоздки, а их эффективность в плане продукции ЦБ в растениях так и не была продемонстрирована.

В целом обзор производит приятное впечатление, он неплохо структурирован, информативен, богато иллюстрирован различными рисунками и схемами, удачно предваряет экспериментальную часть работы.

Ознакомление с данной главой диссертационной работы Путляева Е.В. может быть полезно другим исследователям, занимающимся репликацией потексвирусов, а также конструированием векторов на основе их геномов.

Глава «Материалы и методы» содержит подробное описание внушительного набора методов генетической инженерии, молекулярной биологии, вирусологии, иммунологии, использованных в работе, в том числе трудоемкой процедуры получения вектора AltMV-single из отдельных фрагментов кДНК ВМАльт. Знакомство с этим разделом диссертации убеждает в высоком, разнообразном и современном экспериментальном уровне этой работы.

Собственно экспериментальная часть работы Путляева невелика по объему, но чрезвычайно убедительна, использованные подходы описаны во введении к первой главы «Результаты и Обсуждение». Автор убедительно обосновывает выбор геномной кДНК ВМАльт-MU в качестве «каркаса» для создания векторов AltMV-single и AltMV-double в силу ряда «биотехнологических» преимуществ ВМАльт-MU перед другими потексвирусами, в том числе способности ВМАльт к эффективной репликации как в модельных растениях *N.benthamiana*, так и в съедобных растениях портулака и способности БО ВМАльт к самосборке в ВПЧ в отсутствии РНК. Наконец, использование оригинальной последовательности геномной РНК ВМАльт-MU в качестве векторного «каркаса» должно обеспечивать патентную чистоту разрабатываемых на ее основе систем продукции ЦБ.

После достаточно трудоемкой и многоэтапной работы по субклонированию фрагментов кДНК ВМАльт-MU Путляеву Е.В. удалось создать на базе бинарного вектора pCambia1300 две базовые векторные конструкции - AltMV-single и AltMV-

double. Обе плазмиды были созданы в соответствии с принципом «деконструированного» вируса, то есть из кДНК-копии вирусного генома были удалены гены трех транспортных белков. Отличие между векторами заключалось в том, что ген БО ВМАльт, выбранный автором в качестве модельного целевого белка, находился в векторе AltMV-single под контролем субгеномного промотора 1, а в векторе AltMV-double под контролем субгеномных промоторов 1 и 3, расположенных один за другим перед целевым геном. Для переноса векторов в растение автор использовал метод агроинfiltrации. Было обнаружено, что вектор AltMV-double обеспечивает существенно более высокую продукцию ЦБ, чем вектор AltMV-single. На 9 день после infiltration содержание БО в экстрактах infiltrationированной растительной ткани составляло рекордные почти 50% от содержания растворимых клеточных белков. В последующих экспериментах было показано, что в infiltrationированных таким вектором листьях табака растительных клетках накапливаются спиралевидные ВПЧ БО. Полученные ВПЧ морфологически не отличались от вирионов, однако имели, в среднем, бóльшую длину.

Обнаруженное различие в уровнях экспрессии между AltMV-double и AltMV-single автор объяснил сохранением транскрипционной активности обоих промоторов в составе вектора AltMV-double. Данное предположение было подтверждено в опытах по определению размеров синтезируемых транскриптов и по мутационной инактивации одного из промоторов. С помощью разработанного вектора AltMV-double были успешно экспрессированы гены зеленого флуоресцентного белка, фрагмента гемагглютинаина гриппа А и человеческого цитокина – гранулоцитарно-макрофагального фактора роста. Необходимо особо отметить рекордный достигнутый уровень продукции чГ-КСФ (до 590 мг в 1 кг сырой листовой массы) - самый высокий среди других векторов на основе вирусов растений, что является крайне значимым результатом этой диссертационной работы. На основании полученных результатов и их подробного обсуждения автор

формулирует шесть выводов, полностью обоснованных представленными экспериментальными данными и не противоречащих данным научной литературы.

Замечания и недочеты работы.

Работа Е.В.Путляева не свободна от некоторых недостатков. Встречаются отдельные опечатки, неточности, погрешности оформления.

Глава «Обзор литературы»:

1. Не указано наличие метилтрансферазного/гуанилилтрансферазного домена в составе РНК полимеразы ВМАльт (стр. 45).

2. Цитированная работа Mechtcheriakova *et al.*, 2006 (стр. 56) посвящена экспрессии не поверхностного, а нуклеокапсидного антигена вируса гепатита В.

3. В подписи к рисунку 15 (стр. 62) нет ссылки на первоисточник.

4. Несколько избыточным представляется подробное перечисление сведений о функциях белков, кодируемых тройным блоком генов и структурных особенностях БО потексвирусов.

Глава «Материалы и методы»

1. Излишне подробно описаны стандартные методы генетической инженерии.

2. Восприятие материала, посвященного созданию векторов AltMv-single и AltMv-double, затрудняется отсутствием наглядных схем конструирования и сведений о депонировании нуклеотидной последовательности вектора в Genbank. Если последовательность не депонирована, можно было бы привести ее (в стандарте Genbank) в качестве приложения к работе.

Глава «Результаты и обсуждение»

1. Не проведены эксперименты по сравнительному анализу уровней мРНК ЦБ, синтезируемой под контролем созданных векторов. Подобный анализ с использованием, например, РВ-ПЦР с учетом нормировки на уровень стандартной клеточной мРНК (например, бета-актина), позволил бы более надежно отнести

наблюдаемые эффекты повышения эффективности экспрессии ЦБ именно к усилению транскрипции, а не трансляции.

2. Вопреки утверждению автора полученные результаты не позволяют однозначно утверждать, что оба субгеномных промотора в составе AltMV-double работают одновременно, поскольку наблюдаемая гетерогенность мРНК может быть объяснена и попеременной транскрипцией отдельной молекулы матрицы с разных промоторов.

В целом, упомянутые недочеты и пожелания не носят принципиального характера и не снижают высокого теоретического и экспериментального уровня проделанной работы.

Опубликование результатов диссертации в научной печати

Результаты работы Путляева Е.В. представлены в виде печатных тезисов на 5 международных конференциях, а также отражены в 2 статьях в российских научных журналах, рекомендованных ВАК РФ, в каждой из которых соискатель является первым автором.

Жаль, что материалы работы не отражены в патентах на изобретения.

Содержание автореферата

Содержание автореферата соответствует содержанию диссертационной работы и требованиям ВАК РФ.

Заключение

Диссертационная работа Путляева Егора Валерьевича является самостоятельным и завершенным научным исследованием, выполненным на высоком методическом уровне, подтверждающем высокую профессиональную квалификацию соискателя. Представленная работа вносит существенный вклад в современные представления о

процессе экспрессии субгеномных РНК вируса мозаики альтернантеры, а также содержит описание перспективного способа создания высокопродуктивного вектора на основе генома потексвируса. Объем и научный уровень работы полностью соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Путляев Егор Валерьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент:

Кандидат биологических наук
Руководитель группы генетической инженерии грибов,
ведущий научный сотрудник
Федеральное государственное учреждение
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»,
Институт Биоинженерии,
Адрес: 117312 Россия, Москва,
Пр-т 60-летия Октября д.7, корп.1
Тел. (499) 135-62-19;
e-mail: meldarov@mail.ru



М.А. Эльдаров

Подпись к.б.н. М.А. Эльдарова заверяю
Заместитель начальника отдела кадров
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»



И.Н. Шиян

СВЕДЕНИЯ

об официальных оппонентах по кандидатской диссертации Путляева Егора Валерьевича на тему «Новый вирусный вектор на основе генома потексвируса для экспрессии целевых белков в растениях», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология».

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы	Ученая степень, звание	Шифр специальности в совете	Основные научные труды
Эльдаров Михаил Анатольевич	Российская Федерация	Ведущий научный сотрудник, Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», Институт Биотехнологии, руководитель группы генетической инженерии грибов.	кандидат биологических наук	Молекулярная биология 03.01.03	1. Мещерякова Ю.А., Эльдаров М.А., Мигунов А.И., Степанова Л.А., Репко И.А., Киселев О.И., Ломоносов Д.П., Скрыбин К.Г. Химерные частицы вируса мозаики коровьего гороха, несущие внеклеточный домен М2-белка вируса гриппа типа А: получение и характеристика. Молек биология, 2009 43(5): 741-750. 2. Thuenemann E.C., Lenzi P., Love A.J., Taliansky M., Bécares M., Zufiiga S., Enjuanes L., Zahmanova G.G., Minkov I.N., Matić S., Noris E., Meyers A., Hattingh A., Rybicki E.P., Kiselev O.I., Ravin N.V., Eldarov M.A., Skryabin K.G., Lomonosoff G.P. The use of transient expression systems for the rapid production of virus-like particles in plants.// Curr. Pharm. Des. 2013. 19(31):5564-5573. 3. Андрианова Е.П., Кременчугская С.Р., Луговская Н.Н., Майорова Т.К., Борисов В.В., Эльдаров М.А., Равин Н.В., Фолимонов А.С., Скрыбин К.Г. Полиэпитопный белок вируса ящура, полученный в бактериях и растениях, вызывает протективный иммунитет в морских свинках. Биохимия 2011. 76(3):415-424. 4. Khatuntseva S.A., Eldarov M.A., Redo V.A., Skryabin K.G. Purification and immobilization

					of recombinant variants of Brevundimonas diminuta glutaryl-7-aminocephalosporanic acid acylase expressed in Escherichia coli cells.// J. Biotechnol. 2008. 133(1):123-126. 5. Mechtcheriakova I.A., Eldarov M.A., Nicholson L., Shanks M., Skryabin K.G., Lomonosoff G.P. The use of viral vectors to produce hepatitis B virus core particles in plants.// J. Virol. Methods. 2006. 131(1):10-15.
--	--	--	--	--	--

Кандидат биологических наук,
ведущий научный сотрудник
Руководитель группы генетической инженерии грибов,
Институт Биоинженерии
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»,
Адрес: 117312 Россия, Москва,
Пр-т 60-летия Октября д.7, корп.1
Тел. (499) 135-62-19;
e-mail: meldarov@mail.ru

Эльдаров Михаил Анатольевич.

Шиян Ирина Николаевна

Подпись к.б.н. М.А. Эльдарова заверяю
Заместитель начальника отдела кадров
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский
центр «Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук



ОТЗЫВ ОФИЦИАЛЬНОГО ОППОНЕНТА

на диссертационную работу Путляева Егора Валерьевича «Новый вирусный вектор на основе генома потексвируса для экспрессии целевых белков в растениях», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – «Вирусология».

Вирусные экспрессионные векторы как генетические конструкции, создаваемые на основе генома вируса позволяют экспрессировать гетерологичный белок в отдельных пермиссивных клетках или внутри целого организма. Наряду с векторами, созданными на основе вирусов животных и бактерий, активно развивается направление, связанное с созданием экспрессионных векторов на основе вирусов растений.

Диссертационная работа Путляева Егора Валерьевича посвящена созданию эффективного вирусного вектора, позволяющего экспрессировать различные белки с высокой эффективностью в организмах растений. В качестве основы для вектора автором был избран РНК-содержащий вирус растений, представитель рода *Potexvirus*, - штамм MU вируса мозаики альтернантеры (ВМАльт-MU), описанный на кафедре вирусологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова и представлен метод создания высокоэффективного вектора на основе генома этого вируса. Одним из аспектов подхода к созданию вирусного вектора автором предложено использование двух последовательно расположенных субгеномных промоторов вируса для обеспечения активной экспрессии целевого гена.

Создание вирусных векторов для эффективной экспрессии различных целевых белков в растениях, является комплексной и актуальной научной проблемой. Для получения таких генетических конструкций требуется изучение как функциональных элементов вирусного генома, например картирования промоторов вирусных генов, так и оптимизация вставки гена целевого белка в вирусный геном. При этом важно, чтобы, во-первых, основные функции вирусного генома, такие как репликация, не нарушались, а во-вторых, чтобы вставленный ген экспрессировался с максимально эффективно. Актуальность темы диссертационной работы Путляева Е.В. обусловлена тем, что она включает в себя решение этих задач, представляющих интерес как с точки зрения вирусологии, так генетической инженерии и биотехнологии в целом.

Диссертационная работа Путляева Е.В. построена по традиционному принципу. Общий объем текста диссертации составляет 145 страниц. Текст

разбит на следующие главы: введение, обзор литературы, методическая часть, результаты и их обсуждение, выводы и список литературы, включающий 171 источник. Диссертация содержит 33 рисунка и 2 таблицы. Отдельно хотелось бы отметить высокое качество иллюстраций, представленных в работе.

В главе «Введение» автором четко сформулированы как цели и задачи работы, так и актуальность работы в целом. В главе «Обзор литературы» автором подробно разобраны и систематизированы представленные в научной литературе данные о репликации генома потексвирусов, о функциях белков, кодируемых геномами этой группы вирусов, и имеющиеся данные о структуре генома и других особенностях ВМА. Кроме того автором проанализированы литературные данные, касающиеся методов создания вирусных векторов на основе генома представителей рода *Potexvirus* и их эффективность. В главе «Материалы и методы» приведены подробные описания методов, материалов и оборудования, использованных в представленной работе. Подробность описания экспериментов свидетельствует об адекватности использованных методов и убеждает в возможности воспроизвести представленные результаты квалифицированному исследователю.

Глава «Результаты и Обсуждение» состоит из пяти разделов. В первом разделе описано создание двух векторов на основе генома ВМА. Первый из созданных векторов (AltMV-single) представлял собой классический деконструированный вектор. Второй - (AltMV-double) имеет отличия в строении – в нем ген модельного целевого белка находится под контролем двух последовательно расположенных вирусных промоторов синтеза субгеномных РНК. На основании результатов исследования эффективности накопления модельного целевого белка с помощью этих векторов сделан вывод о безусловном преимуществе второго вектора. В следующем разделе главы приведены результаты по транскрипционной активности обоих промоторов в составе второго вектора. Третий раздел главы посвящен экспрессии в модельных растениях с помощью вектора с двумя промоторами таких целевых белков, как зеленый флуоресцентный белок, растворимый фрагмент гемагглютинаина вируса гриппа и человеческого гранулоцитарного колониестимулирующего фактора. Последний раздел главы посвящен возможностям увеличения эффективности экспрессии путем добавления третьего субгеномного промотора перед геном целевого белка. Хотелось бы отдельно отметить, что каждый экспериментальный

раздел главы заканчивается анализом и обсуждением полученных результатов и формулировкой промежуточных выводов.

Представленные в конце работы выводы логически обоснованы и отражают полученные экспериментальные данные.

Следует отметить ряд замечаний, которые соискатель может учесть в последующей работе. В главе «Литературный обзор» подробно разобран процесс репликации потексвирусов и дан общий обзор функций вирусных белков. В то же время, недавно были опубликованы две статьи, в которых приведены данные о том, что транспортные белки потексвирусов принимают участие в образовании сложных структур внутри клетки, сопрягающих, по всей видимости, процессы межклеточного транспорта и репликацию. Эти данные не имеют прямого отношения к созданию вирусного вектора, однако, следуя логике изложения обзора, упоминание этих результатов было бы уместно. Также хотелось бы добавить, что в обзоре литературы можно было бы коротко описать современные подходы создания векторов на основе других РНК-содержащих вирусов. В главе «Материалы и методы» можно уточнить, что электронный микроскоп LEO-912AB изготавливается фирмой Karl Zeiss, а не LEO. По разделу «Результаты и обсуждение» есть несколько замечаний и вопросов, требующих пояснения. В разделе, посвященном исследованию транскрипционной активности субгеномных промоторов (рис. 21) представлены выравнивания установленных последовательностей нуклеотидов образующихся сгРНК и соответствующего вектора. В связи с этим нужно было бы уточнить делалось ли выравнивание с помощью какого-либо пакета программ и если да, то какой. Далее, в разделе, посвященном созданию вирусного вектора с транскрипционно неактивным субгеномным промотором упоминается аналогичный эксперимент 1997 года, описанный коллективом Hemmenway с соавторами. В этой работе описано еще несколько способов транскрипционной деактивации субгеномных промоторов 1 и 3 X-вируса картофеля. Таким образом, остается вопрос, почему выбор авторов пал именно на метод выключения промотора путем замены одного нуклеотида? Автор проводит экспериментальное сравнение транскрипционной активности векторов с одним и двумя субгеномными промоторами, а также вектора с одним активным и одним «отключенным» субгеномным промотором. Было бы целесообразно представить сравнение эффективности транскрипции и репликации исследуемых векторов с помощью метода рвПЦР или методом Нозерн-блоттинга. В работе встречается ряд

опечаток и неточностей. Например, часто встречается выражение «последовательность РНК или праймера» - правильно было бы говорить о последовательности *нуклеотидов* РНК или праймера... Возможно из заглавия работы следовало бы убрать слово «вирусный», поскольку присутствующее в нем слово «потексвирус» подразумевает вирусную основу конструируемого вектора. Однако очевидно, что приведенные выше замечания не носят принципиальный характер и не влияют на общую положительную оценку диссертационной работы.

Основные результаты представленной Е.В. Путляевым работы:

- на основе генома (ВМАльт) штамма MU была сконструирована серия векторов, в том числе AltMV-double, в котором ген целевого белка находится под контролем двух промоторов синтеза сгРНК ВМА;
- установлено, что оба промотора синтеза сгРНК в векторе AltMV-double сохраняют транскрипционную активность, образуя две сгРНК различной длины;
- с помощью вектора AltMV-double получена экспрессия в модельных растениях *Nicotiana benthamiana* целевых белков различного происхождения: зеленый флуоресцентный белок, фрагмент гемагглютинаина вируса гриппа А, человеческий гранулоцитарный колониестимулирующий фактор;
- показано, что добавление дополнительного субгеномного промотора к двум имеющимся в AltMV-double перед целевым геном не приводит к изменению эффективности его экспрессии в модельном растении.

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что поставленная автором главная цель исследования – создание нового вектора для экспрессии целевых белков в растениях,- достигнута.

Работа Е.В. Путляева имеет важное научное и прикладное значение и дополняет наши знания о механизмах репликации РНК ВМАльт-MU. Практическая значимость результатов работы заключается в том, что полученный эффективный вирусный вектор может быть использован для продукции в растениях белков медицинского и промышленного назначения. Применение данного подхода к созданию векторов с использованием двух последовательно расположенных промоторов может позволить получить новые эффективные системы экспрессии на основе других групп РНК-содержащих вирусов.

В целом диссертационная работа Е.В. Путляева написана достаточно подробно, полученные и описанные результаты хорошо проиллюстрированы, их достоверность не вызывает сомнений. Выводы обоснованы и адекватны

проведенным экспериментам. Автореферат полностью соответствует содержанию диссертации, а большая часть основных результатов отражена в опубликованных работах.

Результаты и выводы работы Е.В. Путляева представлены в печатных работах: 2-х статьях в российских научных журналах, рекомендованных ВАК РФ. Материалы диссертации представлялись на 5 международных научных конференциях.

Учитывая вышеизложенное, можно заключить, что диссертационная работа Путляева Егора Валерьевича «Новый вирусный вектор на основе генома потексвируса для экспрессии целевых белков в растениях» представляет интерес с точки зрения развития фундаментальных аспектов молекулярной вирусологии, а также может найти важное прикладное значение с точки зрения биотехнологии. Работа выполнена на высоком научном уровне и соответствует всем требованиям п.9 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденных Постановлением Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 г. №842, предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук, а ее автор Путляев Егор Валерьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Официальный оппонент:

Зав. Лаб. молекулярной диагностики, зав. Отделом международных научных связей Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН.

Тел.: +7 (495) 335-15-11,

Эл. почта: szavriev@ibch.ru

(Адрес: 117997, Российская Федерация, Москва, ГСП-7, улица Миклухо-Маклая, дом 16/10), www.ibch.ru,

тел. +7 (495) 335-01-00

 С.К. Завриев

Подпись д.б.н., профессора, члена-корреспондента РАН С.К. Завриева заверяю:

Ученый секретарь ФГБУ «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, доктор физ.-мат. Наук



 В.А.Олейников

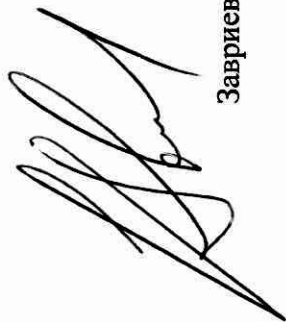
СВЕДЕНИЯ

об официальных оппонентах по кандидатской диссертации Путляева Егора Валерьевича на тему «Новый вирусный вектор на основе генома потексвируса для экспрессии целевых белков в растениях», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – “вирусология”.

Фамилия, имя, отчество	Гражданство	Место основной работы	Ученая степень, звание	Шифр специальности в совете	Основные научные труды
Завриев Сергей Кириакович	Российская Федерация	Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, руководитель лаборатории молекулярной диагностики, заведующий отделом международных научных связей.	Доктор биологических наук, профессор, член-корреспондент РАН	Молекулярная биология 03.01.03	1. Рязанцев Д.Ю., Дробязина П.Е., Хлгатын С.В., Завриев С.К., Свищевская Е.В. Экспрессия аллергенов клещей домашней пыли Der f 1 и Der f 2 в листьях <i>Nicotiana benthamiana</i>.//Биоорганическая химия. 2014. 40, 468-478. 2. Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К. Эффективный метод диагностики и идентификации вирусных патогенов картофеля.// Мол. биол. 2009. 43(3), 558–567. 3. Кокарев Н.В., Кошкина Т.Е., Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К. Влияние дефектной РНК вируса крапчатости ежи сборной на накопление вирусного капсидного белка в растениях пшеницы.// Доклады РАСХН. 2007. 36, 13–15. 4. Вишниченко В.К., Рязанцев Д.Ю., Завриев С.К. Экспрессия капсидного белка X вируса шалота в различных органах растений <i>Allium sera var. Aggregatum</i>.// Сельскохозяйственная биология. 2005. 1, 104–109. 5. Кошкина Т.Е., Новиков В.К., Завриев С.К. Исследование биологических свойств и структуры генома изолята

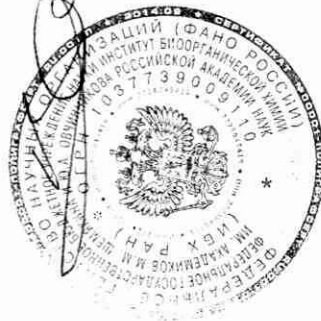
				КЗ казахского штамма вируса табачной мозаики.// Доклады РАСХН. 2002. 3, 14-15. 6. Vishnichenko V.K., Zavriev S.K. Detection of infectious viral particles in plant protoplasts inoculated with transcripts of full-length shallot virus X cDNA.// Arch. Virol. 2001. 146(6). 1213-1217.
--	--	--	--	---

Руководитель лаборатории молекулярной диагностики, заведующий отделом международных научных связей, ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, доктор биологический наук, профессор, член-корреспондент РАН
 Адрес: 125422, Москва, Тимирязевская улица, д.10/12, кв. 105
 тел. +7 (495) 335-15-11, +7 (495) 336-45-11.; e-mail: szavriev@ibch.ru



Завриев Сергей Кириакович

Подпись д.б.н., профессора, члена-корреспондента РАН С.К. Завриева заверяю
 Ученый секретарь ФГБУН «Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова» РАН, доктор физ.-мат. наук




Олейников Владимир Александрович