

ФАНО РОССИИ
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
ИНСТИТУТ БИОЛОГИИ ГЕНА
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК
(ИБГ РАН)

Вавилова ул., 34/5, Москва, 119334
Тел.: 8(499)135-60-89; 8(499)135-98-84 Факс: 8(499)135-41-05
<http://www.genebiology.ru>; e-mail: info@genebiology.ru
ОКПО 00244660 ОГРН 1027739618037 ИНН 7736020369 КПП 773601001

УТВЕРЖДАЮ
Директор ИБГ РАН, академик

П.Г. Георгиев
« 18 » октября 2015 г.



ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Путляева Егора Валерьевича
«Новый вирусный вектор на основе генома потексвируса для экспрессии
целевых белков в растениях», представленную к защите на соискание
ученой степени кандидата биологических наук по специальности
03.02.02 – «вирусология»

Актуальность избранной темы

Создание вирусных векторов, позволяющих экспрессировать рекомбинантные белки в организмах растений актуальное направление исследований в современной вирусологии и биотехнологии. Растения, как продуценты целевых белков, имеют ряд известных преимуществ перед другими группами организмов, в том числе отсутствие общих с человеком патогенов и простота культивирования. Для создания векторов, обеспечивающих накопление рекомбинантного белка в растениях, часто используют геномы РНК-содержащих вирусов растений в связи с их высокой продуктивностью. В свою очередь, получение таких вирусных векторов требует подробного изучения особенностей молекулярной биологии вируса, использованного в качестве основы для создания

вектора. Диссертационная работа Путляева Егора Валерьевича посвящена созданию эффективного вирусного вектора на основе РНК-содержащего потексвируса растений, а также изучению особенностей его репликации, благодаря чему данная работа является актуальным научным исследованием как в области молекулярной вирусологии, так и биотехнологии.

Новизна научных результатов

В работе Путляева Егора Валерьевича на основе генома вируса мозаики альтернантеры штамма MU создан вирусный вектор AltMV-double. Данный вектор, будучи спроектированным по принципу деконструированного вируса существенно отличается от других векторов этого типа. Впервые ген, кодирующий целевой белок, поставлен в векторе AltMV-double под контролем одновременно двух субгеномных промоторов вируса. В работе убедительно показано, что оба промотора сохраняют транскрипционную активность, вследствие чего вектор AltMV-double имеет существенное преимущество в эффективности накопления целевого белка по сравнению с вектором, в котором экспрессию гена обеспечивает лишь один субгеномный промотор. В работе впервые описан способ блокирования транскрипционной активности одного из субгеномных промоторов вируса мозаики альтернантеры путем внесения однонуклеотидной замены в последовательность вирусного генома. Кроме того, впервые установлены 5'-концевые последовательности субгеномных РНК вируса, образуемых в результате активности субгеномных промоторов 1 и 3 вируса мозаики альтернантеры.

Практическая значимость

Не вызывает сомнения, что вектор AltMV-double, созданный и изученный в ходе работы Е.В. Путляева, представляет практическую ценность для растительной биотехнологии. В работе предоставлены убедительные доказательства того, что созданный вектор существенно превосходит известные на сегодняшний день векторы на основе геномов потексвирусов по продуктивности и скорости накопления целевого белка. Кроме того, доказательство вклада обоих промоторов в высокий уровень экспрессии целевого гена указывает на возможность применения описанного в работе подхода для получения высокоэффективных векторов на основе геномов других потексвирусов.

Оценка содержания диссертации

Диссертация написана согласно общепринятому плану: ее объем составляет 145 страниц машинописного текста; состоит из введения; обзора литературы; главы описания материалов и методов, использованных в работе; главы, посвященной результатам и их обсуждению; заключения и выводов; списка использованной литературы, включающей 171 источник (содержит ссылки на работы как отечественных, так и зарубежных авторов). В работе содержится 33 рисунка и 2 таблицы, наглядно иллюстрирующие полученные данные. В главе «Введение» автор обосновывает актуальность проблемы, формулирует цели и задачи исследования.

В главе «Обзор литературы» автором подробно рассматриваются механизм репликации потексвирусов, описываются функции вирусных белков и их взаимодействие с компонентами клетки растения. Отдельно автор останавливается на характеристиках и описании особенностей молекулярной биологии вируса мозаики альтернантеры – представителя рода *Potexvirus*. В последнем разделе главы автор описывает существующие способы создания вирусных векторов на основе РНК-содержащих вирусов растений, а также описывает векторы на основе геномов различных потексвирусов, перечисляя целевые белки, экспрессированные с помощью этих векторов.

В ходе работы автором был использован широкий спектр методов молекулярной биологии, которые подробно описаны в главе «Материалы и методы».

В главе «Результаты и обсуждение» приводятся данные самостоятельных исследований автора, посвященных созданию нового вирусного вектора на основе генома вируса мозаики альтернантеры, позволяющего достигать высокого уровня продукции целевого белка в растениях. Также в данной главе описаны исследования свойств созданного вектора и его применение для экспрессии трех различных гетерологичных белков в растениях *Nicotiana benthamiana*.

В главе «Заключение» автором изложены основные результаты исследования в полном соответствии с логикой и последовательностью изложения экспериментальных данных. Выводы, сделанные автором на основании полученных экспериментальных данных полностью научно обоснованы.

К замечаниям, имеющимся по данной работе можно отнести ряд стилистических и пунктуационных ошибок, а также опечаток, не имеющих, впрочем, принципиального значения и не затрудняющих прочтение текста диссертации. Кроме того, мы хотели бы обратить внимание автора на то, что в описании результатов указано, что высокий уровень экспрессии модельного целевого белка, полученный с помощью вектора AltMV-double, является одним из самых высоких среди вирусных векторов на основе вирусов растений. Мы считаем, что подобное утверждение не совсем корректно, так как в качестве модельного целевого белка автор использует собственный белок оболочки вируса мозаики альтернантеры. Очевидно, что впечатляющий уровень продукции данного белка является интересным результатом, не являющимся, однако, допустимым критерием сравнения вектора AltMV-double с другими вирусными векторами, за исключением представленных в работе векторов AltMV-single, AltMV-double* и AltMV-triple. В то же время указанный недочет не отменяет того, что с помощью AltMV-double был получен высокий уровень накопления человеческого гранулоцитарного колоние-стимулирующего фактора, превышающий результаты, полученные ранее с помощью наиболее эффективных векторов на основе вирусов растений. Таким образом, упомянутый недочет следует отнести скорее к неточности высказывания, чем к неправильной трактовке результата.

Указанные выше замечания не носят принципиального характера и ни в коей мере не снижают научной и практической ценности представленной работы. В целом следует отметить, что диссертационная работа Е.В. Путляева сделана на высоком методическом уровне, а изложение материала в ней логически выверено. Структура и содержание работы также полностью соответствуют поставленным целям. Автореферат полностью раскрывает содержание диссертации. Основные положения диссертации опубликованы в 2 научных публикациях, в которых Е.В. Путляев является первым автором – обе в журналах, рекомендованных ВАК. Материалы диссертации доложены и представлены на 5 международных научных конференциях.

Заключение

Диссертационная работа Путляева Егора Валерьевича «Новый вирусный вектор на основе генома потексвируса для экспрессии целевых белков в

растениях», является законченным научно-квалификационным трудом, выполненным на высоком методическом уровне с использованием современных методов исследования. Результаты, представленные в данной работе, имеют большую значимость для исследования процесса репликации вируса мозаики альтернантеры, а также для будущих исследований в области создания высокоэффективных экспрессионных векторов на основе генома РНК-содержащих вирусов растений.

По своему содержанию, актуальности и новизне, методическому и научному уровню, а также практической ценности результатов диссертационная работа соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения научных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г., предъявляемым к кандидатским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.02 – вирусология.

Отзыв обсужден и утвержден на межлабораторном научном семинаре Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт биологии гена» Российской академии наук (протокол № 2 от 27 октября 2015 года).

Главный научный сотрудник
лаборатории структурно-функциональной
организации хромосом ИБГ РАН,
д.б.н., профессор
тел. (499)1359787
iarovaia@inbox.ru

Яровая Ольга Владимировна

ПОДПИСЬ О. В. Яровой
ЗАВЕРЯЮ .
Ученый секретарь ИБГ РАН Мансурова Г. В.

24.10.2015г.