АННОТАЦИЯ

диссертационной работы на соискание степени доктора философии (Ph.D.)
по специальности 6D060700 - Биология

ГРИЦЕНКО ДИЛЯРА АЛЕКСАНДРОВНА

Создание вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в растениях и исследование эффективности их экспрессии

Диссертационная работа посвящена созданию вирусного вектора на основе генома вируса А винограда для получения рекомбинантных белков в растениях. В работе созданы два вектора, один разработан на основе полного генома вируса А винограда, второй путем деконструирования генома - замена открытой рамки считывания (ОРС) 4 на гетерологичный ген. Работоспособность векторов была проверена путем внесения гетерологичных генов: ген зеленого флуоресцентного белка (ЗФБ); ген капсидного белка вируса хлоротической пятнистости листьев яблони (ВХПЛЯ).

Целью исследования явилось разработка вирусного вектора на основе генома вируса А винограда для получения рекомбинантных белков в растениях и исследование эффективности их экспрессии.

Для достижения цели были поставлены следующие **задачи**:

- провести филогенетический анализ РА-3 изолята вируса А винограда
- модифицировать вирусный геном ВАВ путем внесения гетерологичного гена между ОРС4, кодирующей капсидный белок вируса, и ОРС5, кодирующей супрессор РНК-интерференции.
- модифицировать вирусный геном ВАВ путем замены ОРС4, кодирующей капсидный белок вируса, на гетерологичный ген.
- изучить экспрессию гетерологичного белка в вирусном векторе, основанном на полном геноме вируса (внесение гетерологичного гена между ОРС4 и ОРС5).
- разработать трансгенные растения, несущие ген капсидного белка ВАВ.
- изучить экспрессию гетерологичного белка в вирусном векторе, основанном на деконструированном геноме вируса (замена ОРС4 на гетерологичный ген).

В работе было создано два вектора, один вектор был разработан путем внесения дополнительного гена в геном вируса, между ОРС4 и ОРС5, второй вектор был разработан путем замены ОРС4 на гетерологичный ген. Целевой ген находился в одной рамке с ОРС4 и ОРС5 ВАВ для первого вектора, а для второго вектора, в одной рамке с областью перекрытия ОРС3 и ОРС4 и с ОРС5. Впервые для ВАВ гетерологичные гены были внесены под контроль

субгеномного промотора ОРС4. Рекомбинантный белок ко-трансляционно отсоединялся от белков вируса с помощью саморазрезающихся 2А-пептидов. Для анализа работоспособности вирусных векторов вносились ген, кодирующий капсидный белок ВХПЛЯ и ген ЗФБ. Эффективность экспрессии гетерологичных генов анализировалась на уровне транскрипции и трансляции. Результаты гибридизации вирусной РНК со специфичной пробой, для двух вирусных векторов, показали наличие субгеномной РНК, кодирующей гетерологичный ген. Денситометрический анализ для вирусного вектора с заменой ОРС4 показал, что количество субгеномной РНК гетерологичных генов при агроинфильтрации нетрансгенных растений в 7 раз ниже по сравнению с количеством субгеномной РНК при агроинфильтрации трансгенных растений, несущих ген капсидного белка ВАВ. Аналогичная закономерность была прослежена при сравнении количества субгеномной РНК гетерологичного гена в вирусном векторе при агроинфильтрации нетрансгенного растения и количества субгеномной РНК капсидного белка ВАВ при агроинфильтрации нетрансгенного растения немодифицированным ВАВ. Отсутствие экспрессии капсидного белка в вирусном векторе приводит к предотвращению локального и соответственно системного транспорта, быстрой деградации как геномной, так и субгеномных РНК, несмотря на наличие супрессора РНК-интерференции. Ввиду чего были созданы трансгенные растения, несущие ген капсидного белка ВАВ, для повышения количества целевого белка. При деконструировании генома, как правило, экспрессию вирусных белков, гены которых были удалены из вирусного генома, восстанавливают в транс-системах. За счет удаления вирусных генов, возможно внесение протяженных гетерологичных генов. Анализ экспрессии рекомбинантных белков для двух разработанных вирусных векторов показал, что целевые белки экспрессируются в отделенном виде от вирусных белков. Количество гетерологичного белка для вектора на основе полного генома соответствует количеству капсидного белка ВАВ немодифицированного генома. Анализ эффективности экспрессии целевого белка в вирусном векторе с заменой ОРС4 показал, что количество целевого белка при агроинфильтрации нетрансгенных растений в 7 раз ниже по сравнению с количеством целевого белка и КБ ВАВ при агроинфильтрации трансгенных растений вирусным вектором и при агроинфильтрации нетрансгенного растения немодифицированным ВАВ соответственно. Отсутствие экспрессии капсидного белка значительно влияет на накопление как субгеномной РНК, кодирующей гетерологичный ген, так и самого целевого белка. Повышение эффективности экспрессии рекомбинантного белка возможно через восстановление экспрессии капсидного белка ВАВ в транс-системах, в данном случае путем создания трансгенных растений. Полученные вирусные векторы на основе генома ВАВ являются стабильными, безопасными для окружающей среды, так как вирус ВАВ способен заражать только виноград и табак, шансы переноса трансгена очень низкие. Экспрессия гетерологичных

белков сохраняется на нативном уровне вирусной экспрессии капсидного белка.

Основные положения, выносимые на защиту:

1. Изолят РА-3 вируса А винограда по филогенетическому анализу распределяется в группу I, изоляты данной группы обладают средней патогенностью и не вызывают обширного некроза.

2. Уровень экспрессии гетерологичных белков в вирусном векторе на основе полного генома ВАВ соответствует уровню экспрессии капсидного белка немодифицированного ВАВ.

3. Вирус на основе полного генома ВАВ способен передвигаться по растению как локально, так и системно. Дополнительные 19 аминокислот на С-конце капсидного белка ВАВ не препятствуют упаковке вируса в капсид.

4. Уровень накопления субгеномных РНК, кодирующих гетерологичный ген, и гетерологичных белков в трансгенных растениях выше в 7 раз по сравнению с уровнем накопления в нетрансгенных растениях для вирусного вектора с заменой открытой рамки считывания 4 на гетерологичный ген. Разработанные трансгенные растения несут ген капсидного белка ВАВ.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Полученные результаты исследования значительно расширяют знания в области молекулярной биологии вируса А винограда. Впервые показано, что гетерологичный ген может быть расположен под контроль субгеномного промотора вируса А винограда несмотря на перекрывающиеся рамки считывания вирусного генома. Определено, что внесение гетерологичных генов в геном вируса А винограда между ОРС4 и ОРС5 не влияет на транскрипцию и амплификацию вируса. Показана возможность упаковки вируса в капсид и передвижение вируса по растению при наличии дополнительных 19 - и аминокислот на С-конце капсидного белка ВАВ. Определено, что удаление капсидного белка из генома ВАВ значительно влияет на накопление вирусной РНК и белков. Получение рекомбинантных белков в растениях с помощью вектора с заменой ОРС4 может осуществляться только при восстановлении экспрессии капсидного белка ВАВ в транс-системах.

Разработанные вирусные вектора на основе генома вируса А винограда могут быть использованы для получения рекомбинантных белков в растениях для нужд медицины и сельского хозяйства. Вирусные вектора занимают лидирующую позицию в создании вакцин и экспрессии антител, пептидных гормонов. Получение рекомбинантного белка может быть осуществлено за 4-10 дня при использовании современной магнифекшн технологии. 2А пептиды в разработанных вирусных векторах позволят внести более чем один гетерологичный ген, что является актуальным при экспрессии антител или вирусоподобных частиц (ВПЧ) при разработке вакцин.

Разработанные вирусные вектора могут быть использованы в научных целях, для исследования процессов РНК-интерференции, молекулярных

механизмов передвижения вирусов, взаимодействия хозяин – патоген, функциональной геномики винограда.

На основании полученных результатов сделаны следующие выводы:

1. Установлено, что изолят РА-3 вируса А винограда был распределен в 1-ю группу по результатам филогенетического анализа при использовании аминокислотных последовательностей РНК – зависимой РНК – полимеразы и капсидного белка.

2. Был разработан вирусный вектор на основе полного генома вируса А виограа путем внесения гетерологичного гена между ОРС4 и ОРС5.

3. Был разработан вирусный вектор путем деконструирования генома вируса А винограда, а именно была произведена замена ОРС4 на гетерологичный ген.

4. Установлено, что уровень экспрессии гетерологичного белка в вирусном векторе на основе полного генома ВАВ соответствует уровню экспрессии капсидного белка в немодифицированном вирусе. Экспрессия гетерологичных белков происходит в разделенной форме от вирусных белков. ВАВ с дополнительным гетерологичным геном между ОРС4 и ОРС5 способен передвигаться по растению несмотря на наличие дополнительных 19 аминокислот на С-конце капсидного белка.

5. Были разработаны трансгенные растения *Nicotiana benthamiana*, несущие ген капсидного белка вируса А винограда. Экспрессия капсидного белка подтверждена иммуноблотингом.

6. Выявлено, что уровень экспрессии гетерологичных белков в вирусном векторе с заменой ОРС4 при агроинфильтрации трансгенных растений в 7 раз выше уровня экспрессии гетерологичных белков в нетрансгенных растениях. Эффективное получение рекомбинантных белков в векторе с заменой ОРС4 возможно исключительно путем восстановления экспрессии капсидного белка ВАВ в транс – системах.

Основные результаты диссертационной работы были доложены:

- на Международной конференции «Plant biology and biotechnology. International conference» (2014, Алматы, Казахстан);
- на Международной конференции «Global Genome Bodiversity Network (GGBN)» (2014, Лондон, Англия);
- на Международной конференции «Глобальные изменения климата и Биоразнообразие» (2015, Алматы, Казахстан);
- на IV Международных Фарабиевских чтениях (2017, Алматы, Казахстан);
- на 4-ой Международной конференции «Генетика, Геномика, Биоинформатика, и Биотехнология растений»» (2017, Алматы, Казахстан);
- на Международном самите «Global summit on Plant Science» (2017, Рим, Италия);
- на Международной конференции «SmartBio» (2017, Каунас, Литва);
- на Международной конференции «International virology conference» (2017, Торонто, Канада);

- на 5-х Международных Фарабиевских чтениях (2018, Алматы, Казахстан).

По материалам диссертационного исследования опубликовано 19 печатных работах, в том числе 3 статьи и 1 тезис в журналах, входящих в базу Scopus, 5 статей в республиканских научных журналах из перечня Комитета, 10 тезисов в материалах международных конференций и саммитов, 2 патента, 1 заявка на патент, 2 авторских свидетельства и 2 акта внедрения в производство научно-технической разработки.