**Отзыв**
**на диссертационную работу**
**ГРИЦЕНКО ДИЛЯРЫ АЛЕКСАНДРОВНЫ**
**«Создание вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в растениях и исследование эффективности их экспрессии»,**
**представленную на соискание ученой**
**степени доктора философии (PhD)**
**по специальности 6D060700 – Биология**

Использование трансгенных растений как биофабрик для производства гетерологичных белков в растениях, получения антивирусных вакцин, антител, глюкоцереброзидазы для нужд медицины и сельского хозяйства является очень актуальным направлением генетической инженерии. Ранее такие белки получали исключительно в дрожжах и клетках животного происхождения. Использование растений как биофабрик, в отличие от животных, дает ряд преимуществ и главные из них это отсутствие общих патогенов для растений и животных, отсутствие необходимости в специализированном оборудовании для выращивания растений по сравнению с выращиванием клеток животных, быстрое увеличение производства целевого белка. Однако в последнее время трансгенные растения для производства целевых белков практически не используются, что связанно с развитием метода транзиентной экспрессии при использовании вирусных векторов. Преимуществом транзиентной экспресии является гибкость системы, высокий и быстрый выход гетерологичного белка (2-10 дней). Получение рекомбинантных белков с помощью транзиентной экспрессии оценивается в 10-30% от количества общего растворимого белка, что в разы больше по сравнению с получением белков в трансгенных растениях. Для разработки вирусных векторов и получения целевых продуктов в растениях в промышленных масштабах используют две основные стратегии. Первая стратегия основывается на использовании полного генома вируса с дополнительной инсерцией гетерологичного гена. При этом вирус сохраняет вирулентность, и процессы жизненного цикла вируса не нарушены. Но при этом данный метод обладает рядом недостатков, к которым относятся: низкая естественная вирулентная способность вируса (вирус не способен заразить все клетки растений); узкая специфичность; высокий уровень экспрессии собственных белков, и особенно капсидного белка (экспрессия гетерологичного белка ниже, чем экспрессия капсидного белка вируса); образование вирионов (образование вирионов приводит к повреждению клеток и тканей растений, что ведет к некрозу растительных тканей и, тем самым, останавливает распространение вирусной инфекции). В связи с этим были разработаны вирусные векторы второго поколения, так называемые деконструированные векторы. Для создания такого вектора используется стратегия «деконструированного генома» когда геном вируса модифицируют путем удаления одного или

нескольких генов вируса с последующей заменой на гетерологичный ген. В большинстве случаев заменяется ген, кодирующий капсидный белок, так как субгеномные промоторы капсидных белков являются очень сильными, поэтому именно капсидный белок обнаруживается в зараженных растениях. Исходя из вышесказанного целью диссертационной работы было создание вирусного вектора на основе генома вируса А винограда для экспрессии рекомбинантных белков в растениях.

1. Актуальность темы исследования и ее связь с общенаучными и общегосударственными программами.

Увеличение производства биофармакологических препаратов для нужд медицины, сельского хозяйства через совершенствование генно-инженерных технологий получения рекомбинантных белков в растениях является актуальным направлением исследований, как в общенаучном, так и практическом аспекте. Диссертационная работа была выполнена в рамках научных проектов 1334/ГФ «Разработка вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в растениях», № AP05132367 «Биотехнология получения вакцин в растениях с использованием вирусного вектора» общегосударственных программ. На данный момент, известные вирусные векторы для получения целевых продуктов в растениях в промышленных масштабах основываются на геномах следующих вирусов: вируса табачной мозаики, Х вируса картофеля, вируса мозаики коровьего гороха, вируса мозаики люцерны. Среди отечественных вирусных векторов известны разработки по модификации генома вируса кустистой карликовости томатов, однако работ по экспрессии коммерческих рекомбинантных белков в отечественных векторах не известно.

Получение рекомбинантного белка при использовании современной комплексной технологии, когда в разработанных вирусных векторах 2А пептиды позволяют внести более чем один гетерологичный ген является актуальным при экспрессии антител или вирусоподобных частиц (ВПЧ) при разработке вакцин. С помощью разработанных векторов, в растениях *Nicotiana benthamiana* могут быть успешно экспрессированы целевые белки на уровне экспрессии капсидного белка дикого вируса А винограда. Разработанные вирусные векторы могут быть использованы в научных целях, для исследования процессов РНК-интерференции, молекулярных механизмов передвижения вирусов, взаимодействия хозяин – патоген, функциональной геномики винограда.

2. Научные результаты и их обоснованность.

Целью представленной диссертационной работы является разработка вирусного вектора на основе генома вируса А винограда для получения рекомбинантных белков в растениях и исследование эффективности их экспрессии.

Результаты исследований, предложенные в диссертационной работе, включали несколько этапов:

-Проведение филогенетического анализа РАЗ изолята вируса А винограда;

-Модификация вирусного генома BAB путем внесения гетерологичного гена между ORC4, кодирующей капсидный белок вируса, и ORC5, кодирующей супрессор РНК-интерференции.

- Модификация вирусного генома BAB путем замены ORC4, кодирующей капсидный белок вируса на гетерологичный ген.

-Изучение экспрессии гетерологичного белка в вирусном векторе, основанном на полном геноме вируса (внесение гетерологичного гена между ORC4 и ORC5).

- Изучение экспрессии гетерологичного белка в вирусном векторе, основанном на деконструированном геноме вируса (замена ORC4 на гетерологичный ген).

Поставленная цель и задачи исследований полностью решены, научно обоснованы выводы, заключение и даны предложения производству. Результаты работы соответствуют поставленным целям и задачам.

Представленный в диссертационной работе обзор литературы, включающий ссылки на 358 источников, в основном зарубежных авторов последних лет, полностью раскрывает предмет исследований и мировые тенденции решения сходных проблем.

В результате решения поставленных задач впервые для вируса А винограда гетерологичные гены были внесены под контроль субгеномного промотора ORC4. 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 ORC4 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 BAB. Созданы трансгенные растения, несущие ген капсидного белка BAB, для повышения количества целевого белка. Анализ экспрессии рекомбинантных белков для двух разработанных вирусных векторов показал, что целевые белки экспрессируются отдельно от вирусных белков. Количество гетерологичного белка для вектора на основе полного генома соответствует количеству капсидного белка BAB не модифицированного генома. Полученные вирусные векторы на основе генома BAB являются стабильными, безопасными для окружающей среды, так как вирус BAB способен заражать только виноград и табак, шансы переноса трансгена на другие виды растений очень низкие. Экспрессия гетерологичных белков сохраняется на нативном уровне вирусной экспрессии капсидного белка.

3. Степень обоснованности и достоверности каждого научного результата, выводов и заключения соискателя, сформулированных в диссертации

На основании полученных результатов диссертантом сделаны выводы:

1. Установлено, что изолят РА3 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 винограда 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 не модифицированном 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.

Представленные выводы научно обоснованы полученными данными по изучению: 1-филогенетического анализа Вируса А винограда, что позволило выявить генетическое родство 12 изолятов ВАВ, представленных в генетической базе NCBI, определить консервативные и высокомутабельные регионы геномов, отбрать промоторы из других изолятов для дупликации в геноме вирусного вектора с сохранением стабильности вектора, выявить подходящие регионы для модификации генома; 2- Разработка вирусного вектора на основе полного генома ВАВ в результате чего был разработан вектор путем внесения гетерологичного гена под контроль субгеномного промотора ОРС4. Гетерологичный ген располагался между ОРС4 и ОРС5. Стоп-кодоны капсидного белка ВАВ и целевого белка были удалены. Гетерологичными генами являлись ген усиленного флуоресцентного белка и ген капсидного белка вируса хлоротической пятнистости листьев яблони. Каждый из генов вносился по отдельности в вектор. Экспрессия гетерологичного белка происходила через 3'-терминальную субгеномную РНК, соответствующую капсидному белку ВАВ в немодифицированном геноме. Для разработанного Т- вектора была подана заявка на патент;
3 - Разработка вектора путем деконструирования генома ВАВ. Замена ОРС4 на гетерологичный ген. В этой части работы вирусный вектор на основе генома ВАВ для экспрессии гетерологичных белков в растениях был

разработан путем замены ОРС4 ВАВ на гетерологичный ген. Для повышения эффективности экспрессии гетерологичных белков, были разработаны трансгенные растения *Nicotiana benthamiana*, несущие ген капсидного белка ВАВ. Эффективность разработанного вектора была анализирована при инфильтрации трансгенных и нетрансгенных растений. Было показано, что внесенные рекомбинантные гены под контроль субгеномного промотора ОРС4, успешно экспрессируются с сохранением эффективности экспресии в трансгенных растениях. Преимущество разработанного вектора заключается в возможности внесения протяженных генов без влияния на стабильность вируса. Удаление вирусных генов приводит к накоплению большего количества целевых белков благодаря отсутствию конкуренции за энергетические ресурсы. Для вектора на основе деконструированного генома ВАВ была подана заявка на патент.

Вышеизложенное и две поданные заявки на патент подтверждают, что научный результат, выводы и заключение соискателя, представленные в диссертации являются полностью достоверными и обоснованы проведенными научными исследованиями.

4. Степень новизны каждого научного результата.

Полученные результаты исследования значительно расширяют знания в области молекулярной биологии вирусов и усовершенствования их использования в качестве векторов генов целевых продуктов в трансгенные растения. 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 капсидный белок и передвижение вируса по растению при наличии дополнительных 19 - ти 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.

5. Практическая и теоретическая значимость научных результатов.

В целом представленная диссертация выполнена на мировом научном и методологическом уровне, представляет собой законченную научную работу с возможностью дальнейшего использования полученных результатов в медицине и сельском хозяйстве. 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 BAB. Определено, что удаление капсидного белка из генома BAB 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 BAB 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.

6. Замечания, предложения по диссертации.

Имеются некоторые замечания по содержанию и оформлению диссертации:

- В содержании номера страниц не соответствуют содержанию по тексту;

-Название вирусов в литературе, как правило, дается на английском языке;

-В структуре диссертации нет структурного элемента – определения. В правилах по оформлению диссертаций сказано, что определения можно объединить с обозначениями и сокращениями;

- Нет ни одной ссылки на статистические данные по РК, представленные в диссертации на 6 и 21 страницах;

-Слишком большой список литературы – 358 источников, обычно в PhD диссертациях список ограничивают максимально 200 публикациями. В правилах по оформлению диссертаций сказано, что после нумерации источников литературы точки не ставятся;

- В списке литературы представлена одна и та же публикация под двумя номерами - №14 и №64; Начиная с 328 публикации наблюдается сбой ссылок;

- Все иллюстрации должны идти сразу после упоминания, или с начала следующей страницы. В диссертации (в главе «Обзор литературы») читаешь ссылку на иллюстрацию, а потом ищешь ее по тексту;

- Виноград относится не к плодовым культурам, а к ягодным, стр. 21. Там же, инфицированность составляет до 80% не полей, а виноградников.

- На стр. 21, 85,86,124 имеются опечатки и не корректная орфография;

- Стр. 85- в методике указано, что семена обрабатывались 10% отбеливателем. Правильнее указать какой отбеливатель использовался, например гипохлорит натрия или калия.

- В таком большом списке литературы – 358 источников нет ни одной ссылки на работы по идентификации и изучению вирусов винограда, проведенных в лаборатории вирусологии и биотехнологии КазНИИПиВ где в 80-90-е годы прошлого столетия интенсивно изучались вопросы диагностики, идентификации, распространения вирусной инфекции на всех плодовых, ягодных культурах и винограде, способов оздоровления. Вирус Grapevine fanleaf virus (короткоузлие) винограда был впервые идентифицирован в Казахстане не в институте биологии и биотехнологии, как отмечено в диссертации, а Разживиным А.А. в 80-е годы прошлого столетия в КазНИИПиВ. Он изучал различные методы диагностики вирусов, поражающих виноград, их вредоносность и переносчиков (Влияние вирусов на продуктивность винограда//Вестник сельскохозяйственной науки Казахстана.- Алма-Ата.- 1988.- №10.- с.45-48), в 2002г. написал монографию «Нематоды растений Казахстана».

-В таблице 1 на стр.33 имеется повтор строк.

7. Соответствие содержания диссертации в рамках требований Правил присуждения ученых степеней.

Содержание диссертации изложено на 179 страницах, иллюстрирована 7 таблицами и 65 рисунками, включает 11 приложений и список литературы из 358 источников. Основные результаты исследований опубликованы в 19-ти печатных работах, в том числе 3 статьи и 1 тезис в журналах с импакт-фактором, 5 статей в республиканских научных журналах из перечня Комитета, 10 тезисов в материалах 8-ми международных конференций и саммитов, 2 патента, 1 заявка на патент и 2 авторских свидетельства, 2 акта внедрения научно-технической разработки.

Актуальность темы, научная новизна, современная методология, объем проведенных исследований и их анализ с использованием самых современных методов исследования, полная реализация поставленных целей и задач, практические рекомендации по использованию разработанных вирусных векторов на основе генома вируса А винограда для получения рекомбинантных белков в растениях для нужд медицины и сельского хозяйства, показывает, что автором проведен очень большой объем работ по молекулярным исследованиям для получения рекомбинантных белков в растениях с привлечением современных методов в области создания векторов переноса генов и указывает на высокий профессионализм диссертанта. Выполненная работа полностью соответствует требованиям Правил присуждения ученой степени доктора философии (PhD) по биологическим наукам.

Гриценко Диляра Александровна заслуживает присуждения ученой степени доктора философии (PhD) по специальности 6D060700 - Биология и работа рекомендуется к защите на диссертационном совете.

Рецензент: Долгих С.Г.
канд.биол.наук,
Зав. отделом биологии и
биотехнологии ТОО «КазНИИ
плодоовощеводства

Подпись Долгих С.Г.
подтверждаю
Нач. ОК Бортц

01.06. 2019г