

## АҢДАТПА

(Ph.D) философия докторы дәрежесін алуға арналған диссертация  
6D060700 - Биология мамандығы бойынша

### ГРИЦЕНКО ДИЛЯРА АЛЕКСАНДРОВНА

#### **Өсімдіктерде рекомбинанты белок алу үшін, вирустық векторын жасау және олардың экспрессиясының тиімділігін зерттеу**

Диссертациялық жұмыс өсімдіктердегі рекомбинантты ақуыздарды алу үшін жүзімнің А вирусының геномы негізінде вирустық векторды құруға арналған. Жұмыс нәтижесінде екі вектор құрылды, біріншісі жүзімнің А вирусының толық геномы негізінде құрылған, екіншісі гетерологиялық генге 4-ші ашық оқу қоршауын (АОҚ) ауыстыру арқылы - геномды деконструкция жолы жасалды. Векторлардың жұмыс жасау қабілеттілігі гетерологиялық гендерді енгізумен тексерілді: жасыл флуоресцентті ақуыз (ЖФА) гені ; алма жапырағының хлоротикалық теңбілділік вирусының (АЖХТВ) капсидтік ақуыз гені.

Зерттеу мақсаты өсімдіктерден рекомбинантты ақуыздарды алу және олардың экспрессиялық тиімділігін зерттеу үшін жүзімнің А вирусының геномы негізінде вирустық векторды құрастыру болды.

Мақсатқа жету үшін келесі міндеттер қойылды:

- жүзімнің А вирусының РА-3 изолятының филогенетикалық талдауын жүргізу
- вирустың капсидті ақуызын кодтайтын 4АОҚ және РНҚ – интерференцияларды кодтайтын супрессор 5АОҚ арасына гетерологиялық генді енгізу арқылы ЖАВ вирустық геномды модификациялау
- вирустың капсидті ақуызын кодтайтын 4АОҚ -ті гетерологиялық генге ауыстыру арқылы ЖАВ вирустық геномды модификациялау
- вирустың толық геном негізінде, вирустық вектордағы гетерологиялық ақуыздың экспрессиясын зерттеу ( 4АОҚ және 5АОҚ арасына гетерологиялық генді енгізу).
- ЖАВ капсидтік ақуызды генді тасымалдайтын, трансгенді өсімдіктерді дамыту.
- гетерологиялық ақуыздың вирустық вектордағы деконструктивті вирустық геномға негізделген ( 4АОҚ гетерологиялық генмен ауыстыру) дәлдігін зерттеу.
- Қайта құрастырылған вирус геномы негізінде вирустық вектордағы гетерологиялық ақуыздың экспрессиясын зерттеу (4АОҚ-ті гетерологиялық генге ауыстыру)

Бұл жұмыста екі вектор жасалды, бірінші вектор 4АОҚ және 5АОҚ вирустық геномның арасына қосымша генді енгізу арқылы құрастырылды, екінші вектор 4АОҚ-ті гетерологиялық генге алмастыру арқылы жасалды. Бірінші ЖАВ вектор үшін арнаулы ген 4АОҚ және 5АОҚ бір шеңбер арасында болды, ал екінші вектор үшін 3АОҚ және 4АОҚ және 5АОҚ бір шеңбер аймағында болды.

ЖАВ үшін алғаш рет гетерологиялық гендер субгендік 4АОҚ промоторының бақылауымен енгізілді.

Рекомбинантты ақуыз өздігінен кесетін 2А пептидтерін пайдаланып, вирустың ақуызынан ко-трансляция түрде ажыратылды.

Вирустық векторлардың жұмыс қабілеттілігін зерттеу үшін капсидті ақуызын кодтайтын гені АЖХТВ және ЖФА гені енгізілді.

Гетерологиялық гендердің экспрессиясының тиімділігі транскрипция және трансляция деңгейінде талдау жасалды.

Вирустық арнайы сынамамен РНҚ-ның будандастыру нәтижесі, екі вирустық вектор үшін, гетерологиялық генді кодтайтын субгеномды РНҚ бар екені анықталды.

4АОҚ алмастыруымен вирустық вектордың денситометриялық анализі трансцентті емес өсімдіктерді агроинфилтраттаудағы гетерологиялық гендердің субгеномикалық РНҚ-інің капсидті белок ЖАВ генін тасымалдайтын трансгенді өсімдіктердің агроинфилтрациясындағы субгеномикалық РНҚ-мен салыстырғанда 7 есе төмен екенін көрсетті.

Трансгендік емес өсімдіктің агроинфилтрациясы кезінде және трансформацияланбаған ЖАВ-мен трансгендік емес өсімдіктің агроинфилтрациясы кезінде капсидті ақуыздардың ЖАВ субгеномикалық РНҚ саны кезінде вирустық вектордағы субгеномикалық РНҚ-ның санын салыстырған кезде ұқсас үлгі болды.

Вирустық вектордағы капсидті протеиннің болмауы жергілікті және, тиісінше, жүйелі тасымалдаудың алдын алуға, РНҚ кедергісін басудың болуына қарамастан, геномдық және субгеномикалық РНҚ-ның тез ыдырауы болып табылады. Осыны ескере отырып, ақуыз ЖАВ үшін генді көтеретін трансгенді өсімдіктер мақсатты белоктың мөлшерін көбейту үшін жасалды.

Геномы қалпына келтірілгенде, әдетте, вирустық геномнан гендер жойылған вирустық ақуыздың көрінісі транс-жүйеде қалпына келтіріледі. Вирустық гендердің жойылуына байланысты кеңейтілген гетерологиялық гендерді енгізу мүмкін.

Екі құрастырылған вирустық векторларға арналған рекомбинантты ақуыздардың экспрессияның талдауы мақсатты ақуыздар вирустық ақуыздардан бөлек экспрессияланатынын көрсетті

Толық геномға негізделген вектордың гетерологиялық ақуызының мөлшері өзгермейтін геномның ЖАВ капсидінің мөлшеріне сәйкес келеді

4АОҚ алмастырумен вирустық вектордағы мақсатты ақуыздың экспрессиясының тиімділігін талдау трансгенді емес өсімдіктердің

агроинфилтрациясындағы мақсатты ақуыздың вирустық векторы бар трансгенді өсімдіктердің агроинфилтрациясында және трансформацияланбаған ЖАВ-да трансгенді емес өсімдіктің агроинфилтрациясындағы мақсатты ақуыз және ЖАВ мөлшеріне қарағанда 7 есе төмен екенін көрсетті.

Капсидті ақуыздың болмауы гетерологиялық генді және мақсатты ақуызды кодтайтын субгеномикалық РНҚ-ны жинақтауға айтарлықтай әсер етеді. Транс-жүйедегі ЖАВ капсидті ақуыздың экспрессиясын қайта қалпына келтіру арқылы трансгенді өсімдік алу жолымен рекомбинантты ақуыздың экспрессиясының тиімділігін жоғарылатуға болады.

ЖАВ геномының негізінде алынған вирусты векторлар қоршаған орта үшін тұрақты және қауіпсіз болып табылады, себебі ЖАВ вирусы тек жүзім мен темекіні жұқтыруға қабілетті, трансгенді тасымалдау мүмкіндіктері өте төмен. Гетерогенді ақуыздардың экспрессиясы капсидті ақуыздың вирустық көріністері деңгейінде сақталады.

#### **Қорғауға қатысты негізгі ережелер:**

1 Жүзімнің А вирусының РА-3 изоляты филогенетикалық талдау бойынша I топқа бөлінген, бұл топтың изоляттары орташа патогенділікке ие және кең көлемді некроздың пайда болуына әкелмейді.

2. ЖАВ толық геномының негізіндегі вирустық вектордағы гетерогенді ақуыздардың экспрессия деңгейі модифицирленбеген ЖАВ-ның капсидті ақуызының экспрессия деңгейіне сәйкес келеді.

3. ЖАВ толық геномының негізіндегі вирус өсімдікте жергілікті және жүйелі түрде қозғала алады. ЖАВ-ның капсидті ақуызының С-ң соңындағы қосымша 19 аминқышқылдары капсидтегі вирустың орамасына әсер етпейді.

4. Трансгенді өсімдіктерде гетерологиялық генді және гетерологиялық ақуыздарды кодтайтын, субгеномды РНҚ - ның қорлану деңгейі, гетерологиялық генге 4 ашық оқу қоршауын ауыстырылған вирусты вектор үшін трансгенді емес өсімдіктердегі қорлану деңгейімен салыстырғанда 7 есе жоғары. Құрастырылған трансгендік өсімдіктер ЖАВ капсидтік ақуыз генін тасмалдайды.

#### **Жұмыстың теориялық және практикалық маңызы.**

Алынған зерттеу нәтижелері жүзімнің А вирусының молекулалық биологиясы туралы білімін айтарлықтай кеңейтеді. Вирустық геномның оқыланып жерінің жабылып қалатынына қарамастан, гетерологиялық геннің жүзімнің А вирусының субгеномды промоторының бақылауында бола алатындығы алғаш рет көрсетілген.

Гетерологиялық генді жүзімнің А вирусының геномының 4АОҚ және 5АОҚ аралығына енгізу, вирустың транскрипциясы мен амплификациясына әсер етпейтіні анықталды.

ЖАВ-ның капсидті ақуызының С-ң соңындағы қосымша 19 аминқышқылдары болған кезде вирустың капсидке оралуы және өсімдік бойымен қозғалу мүмкіндігі көрсетілді. ЖАВ геномынан капсидті ақуызды жою, вирустық РНҚ мен ақуыздардың жинақталуына айтарлықтай әсер ететіндігі анықталды. 4АОҚ алмастырылған вектордың көмегімен

өсімдіктерден рекомбинантты ақуыздарды алу, тек транс-жүйелердегі ЖАВ капсидті ақуыздың экспрессиясын қайта қалпына келтіру кезінде ғана жүзеге асырылады.

Жүзімнің А вирусының геномына негізделіп өңделген вирустық векторлар медицина мен ауыл шаруашылығына қажетті өсімдіктерден рекомбинантты ақуыздарды өндіру үшін пайдаланылуы мүмкін. Вирустық векторлар вакциналарды, антиденелерді экспрессиялауда және пептидтік гормондарды құруда жетекші орын алады. Жаңартылған рекомбинанттық ақуыздар алу үшін, қазіргі заманғы күшейту технологиясын қолдану арқылы 4-10 күнде жүзеге асырылуы мүмкін. Құрастырылған вирустық векторлардағы 2А пептидтері бірнеше гетерологиялық генді енгізуге мүмкіндік береді, бұл антиденелерді немесе вирус тәріздес бөлшектерді (ВТБ) экспрессиялау арқылы вакциналарды жасау кезінде тиімді болып келеді.

Өңделген вирустық векторлар ғылыми мақсатта, РНҚ-интерференциялар процестерін, вирус қозғалысының молекулалық механизмдерін, иесі-патогенді өзара әрекеттесуде, жүзімнің функционалды геномикасын зерттеу үшін қолданылуы мүмкін.

#### **Алынған нәтижелер негізінде келесі қорытындылар жасалды:**

1. РНҚ-тәуелді РНҚ-полимеразалар және капсидті ақуыздың аминқышқылдық тізбектерін пайдалана отырып, жүзімнің А вирусының РА-3 изоляты филогенетикалық талдау бойынша I топқа бөлінгендігі анықталды ,
2. 4АОҚ және 5АОҚ арасына гетерологиялық генді енгізу арқылы жүзім А вирусының толық геномы негізінде вирустық вектор құрастырылды.
3. 4АОҚ гетерологиялық генге алмастыру арқылы жүзімнің А вирусін деконструкциялау арқылы вирусты вектор құрастырылды.
4. Толық ЖАВ геномының негізіндегі вирустық вектордағы гетерогенді ақуыздың экспрессия деңгейі өзгертілмеген вирустағы капсидті ақуыздың экспрессиясының деңгейіне сәйкес келетіні дәлелденді. Гетерологиялық ақуыздардың экспрессиясы вирустық ақуыздардан жеке бөлініп жүреді. 4АОҚ және 5АОҚ арасындағы қосымша гетерологиялық гендері бар ЖАВ, капсидті ақуыздың С-соңында қосымша 19 аминқышқыл болғанына қарамастан, өсімдік бойымен қозғала алады.

5. Жүзімнің А вирусының капсидті ақуыз гені бар *Nicotiana benthamiana* трансгендік өсімдіктері жасалды. Капсидті ақуыздың экспрессиясы иммуноблотингпен тексеріліп дәлелденді.

Трансгенді өсімдіктерде гетерологиялық генді және гетерологиялық ақуыздарды кодтайтын, субгеномды РНҚ - ның қорлану деңгейі, гетерологиялық генге 4 ашық оқу қоршауын ауыстырылған вирусты вектор үшін трансгенді емес өсімдіктердегі қорлану деңгейімен салыстырғанда 7 есе жоғары. Құрастырылған трансгендік өсімдіктер ЖАВ капсидтік ақуыз генін тасмалдайды.

4АОҚ алмастырылған вирусты вектордағы гетерологиялық ақуыздардың экспрессиясының деңгейі, трансгенді емес өсімдіктердің гетерологиялық ақуыздар экспрессия деңгейінен агроинфилтрация арқылы жасалған трансгенді өсімдіктерде 7 есе жоғары екендігі анықталды.

4АОҚ алмастыру арқылы вектордағы рекомбинантты ақуыздарды бөліп алу тек қана транс жүйесінде ЖАВ капсидті ақуыздың экспрессиясын қалпына келтіру арқылы ғана тиімді.

**Диссертациялық жұмыстың негізгі нәтижелері баяндалды:**

- «Plant biology and biotechnology. International conference» халықаралық конференцияда (2014, Алматы, Қазақстан);

-«Global Genome Biodiversity Network (GGBN)» халықаралық конференцияда (2014, Лондон, Англия);

- «Климаттың жаһандық өзгеруі және биоалуантүрлілік» халықаралық конференцияда (2015, Алматы, Қазақстан);

- IV халықаралық Фараби оқулары (2017, Алматы, Қазақстан);

-«Генетика, Геномика, Биоинформатика, және өсімдіктер биотехнологиясы»» 4-ші халықаралық конференцияда (2017, Алматы, Қазақстан);

-«Global summit on Plant Science» халықаралық самитте (2017, Рим, Италия);

- «SmartBio» халықаралық конференцияда (2017, Каунас, Литва);

- «International virology conference» халықаралық конференцияда (2017, Торонто, Канада);

- V халықаралық Фараби оқулары (2018, Алматы, Қазақстан).

**Диссертациялық зерттеулер материалдары бойынша жарияланды** 19 баспа жұмыстары, соның ішінде Scopus деректер базасына енгізілген журналдарда 3 мақала және 1 тезис, Комитеттің тізімінен республикалық ғылыми журналдарда 5 мақала, халықаралық конференциялар мен саммиттер материалдарында 10 тезис, 2 патент, 1 патентке өтінім, 2 авторлық куәлік және 2 өндіріске ғылыми-техникалық дамуды жүзеге асыру актісі.