

ОТЗЫВ

на диссертацию PhD-докторанта специальности «6D060700-Биология» Гриценко Д.А. на тему: «Создание вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в растениях и исследование эффективности их экспрессии»

Работа посвящена разработке вирусного вектора на основе генома вируса А винограда для экспрессии рекомбинантных белков в растениях. В настоящий момент, важные рекомбинантные белки, такие как иммуноглобулины, пептидные гормоны, интерфероны, ферменты, биологически активные олигопептиды, антигены для создания вакцин получают в биологических системах животного или растительного происхождения, а также в клетках бактерий и дрожжей. Преимущества продукции рекомбинантных белков в растениях включают: быстрое масштабирование производства, отсутствие дорогих условий выращивания растений по сравнению с культивированием клеток животных, отсутствие общих патогенов у растений и животных. Получение рекомбинантных белков в растениях возможно с помощью трансгенных растений, путем стабильной инсерции гетерологичного гена в геном растений, а также с помощью вирусных векторов. Использование трансгенных растений является первым методом в получении рекомбинантных белков в растениях, метод транзientной экспрессии с помощью вирусов растений был развит позже, но в настоящий момент является доминирующим. Такие крупные компании, как Icon Genetics, Mapp Biopharmaceutical, Fraunhofer Institute for Molecular Biotechnology (IMB), iBio, Caliber Biotherapeutics, PlantForm используют транзientную экспрессию (вирусные вектора) для получения гетерологичных белков в растениях. Помимо продукции рекомбинантных белков в растениях, вирусные вектора могут быть использованы для защиты растений от фитопатогенов, а также для ускоренного отбора генов для целей селекции многолетних растений. Генетическое совершенствование сельскохозяйственных культур, путем внесения гетерологичных генов в геном, может занимать от 5 до 20 лет с незначительным улучшением сорта, использование вирусных векторов позволяет оценить результаты работы желаемых генов - кандидатов в разы быстрее.

Известные коммерческие вектора основаны на геномах вируса табачной мозаики, вируса мозаики люцерны, X вируса картофеля, а также вируса мозаики коровьего гороха. Эффективность экспрессии рекомбинантных белков в растениях с помощью известных векторов может достигать до 5 г на 1 кг сырой массы листьев растений. В то время как получение целевых белков в трансгенных растениях ограничивается количеством целевого белка в 1 г на 1 кг сырой массы. Ранее, в 2006 году, на основе генома вируса А винограда был разработан вектор с внесением гетерологичного гена под контроль субгеномного промотора ORC2. Результаты экспрессии рекомбинантного белка показали, что количество целевого белка слишком низкое и вектор являлся нестабильным из-за дубликации субгеномного промотора ORC2. Замена субгеномного промотора ORC2 на промотор из другого изолята ВАВ привела к сохранению гетерологичного гена в векторе. Разработка вектора на основе генома ВАВ путем внесения гетерологичных генов под контроль субгеномного промотора ORC4 ранее не проводилась, не смотря на то, что внесение целевых генов под контроль субгеномных промоторов капсидных белков является наиболее актуальной методикой получения большого количества рекомбинантных белков. В своей работе, Гриценко Д. разработала два вектора путем внесения гетерологичных генов под контроль субгеномного промотора открытой рамки считывания 4. Один вектор был разработан путем внесения дополнительного гена между открытой рамки считывания 4 и 5, второй вектор был разработан путем деконструирования генома вируса - замена ORC4 на гетерологичный ген. Изучение экспрессии гетерологичных генов осуществлялось на уровне транскрипции и трансляции. 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. Кроме того, было подтверждено передвижение вируса по растению для вектора на основе полного генома ВАВ, дополнительные 19 аминокислот на С- конце не влияют на упаковку в капсид, а также локальный и системный транспорт. 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.

Модифицированный геном ВАВ для двух векторов был внесен в бинарный вектор для доставки в растения с помощью агробактерий и дальнейшего применения метода магнифекши для накопления рекомбинантных белков. Работа является комплексной, поскольку была произведена модификация генома с перекрывающимися рамками считывания, изменение областей перекрытия, как правило, приводит к нарушению вирусной активности.

Исследования, проведенные в работе, имеют теоретическое и практическое значение. Полученные векторы могут быть использованы для изучения функциональной геномики экономически важных сортов винограда, изучения взаимодействий «хозяин-патоген», молекулярных механизмов РНК-интерференции. С помощью данных векторов могут быть экспрессированы вакцинные антигены для сезонных инфекций.

В работе логично выстроены задачи соответственно цели. Все эксперименты правильно организованы с применением высокодостоверных и чувствительных методов молекулярной биологии. Я считаю, что диссертационная работа Гриценко Д.А. на тему: «Создание вирусного вектора для получения рекомбинантных белков в растениях и исследование эффективности их экспрессии» может быть представлена к защите.

PhD, зав. лаборатории молекулярной биологии,
Институт биологии и биотехнологии растений



подпись

Галиакбаров Н.Н.

