

ОТЗЫВ официального оппонента
на диссертацию на соискание ученой степени
доктора биологических наук Мардановой Евгении Сергеевны на тему:
«Разработка систем экспрессии рекомбинантных белков в растениях на
основе самореплицирующихся вирусных векторов и их применение для
получения антигенов возбудителей инфекционных заболеваний»
по специальности 1.5.3. – молекулярная биология

За последние тридцать лет были достигнуты значительные успехи в конструировании и производстве различных вакцин растительного происхождения. Вакцины для человека и животных, а также другие биофармацевтические белки, полученные из растений, в целом безопасны, эффективны и могут быть легко использованы для массового производства. Вакцины растительного производства обеспечивают определенное преимущество для конкретных потребностей, которые часто нелегко удовлетворить с помощью традиционного производства вакцин. Эти преимущества заключаются в обеспечении недорогими вакцинами бедных слоев населения мира, проживающих в развивающихся странах, в быстром накоплении запасов вакцин при пандемических инфекционных заболеваниях и, более того, в эффективном производстве препаратов для персонализированной медицины. Первоначально вакцины и другие фармацевтические белки производились на базе трансгенных растений. Однако, недавние достижения в молекулярной биологии вирусов растений позволили создать альтернативный способ временной экспрессии белков за счет использования векторов экспрессии на базе фитовирусов. Векторы для экспрессии вирусов растений обладают целым рядом преимуществ при экспрессии чужеродных белков по сравнению со стабильно трансформированными растениями. К ним относятся более высокие уровни экспрессии в течение короткого периода времени, способность генерировать белки, которые могут активировать защитные реакции растений, а также снижение проблем, связанных с опасениями настороженного общественного восприятия генетически модифицированных культур. Удаление генов

транспортных белков вируса и белков оболочки препятствует перемещению вирусных векторов экспрессии от растения к растению, и, как следствие, вероятность передачи потенциально опасных генов фармацевтических белков диким растениям. В свою очередь, стабильные трансгенные линии обладают преимуществом обеспечения постоянного генетического ресурса, в котором отсутствует вероятность значительных вариаций в экспрессии чужеродных белков. Кроме того, такие линии могут храниться в виде семян. На ранних этапах в растения вводили конструкции РНК или кДНК, направляющих инфекцию растительными вирусными векторами. При этом общий выход вырабатываемого фармацевтического белка частично определялся специфичностью вируса-вектора и ткани хозяина, а также отсутствием синхронности размножения вирусов в тканях в ходе естественной инфекции. Однако, сегодня эффективность производительности вирусов-векторов существенно повысилась за счет инокуляции растений с помощью агроинfiltrации. При этом обеспечивается проникновение инфекции в большую массу клеток листа растения-хозяина с помощью суспензии, вводимой шприцем и содержащей бактерию *Agrobacterium tumefaciens*, которая является носителем плазмиды, включающей геном вирусного вектора. Вакуумная инфилтрация целых растений или тканей суспензией трансформированных агробактерий также часто используется как средство для введения вирусных векторов в растения. Векторами экспрессии вирусов растений, которые были сконструированы для создания вакцин и других фармацевтических белков, первоначально были плюс-РНК-вирусы, такие как вирус табачной мозаики, X-вирус картофеля (ХВК), вирус огуречной мозаики и вирус мозаики коровьего гороха. Позднее геминивирусы стали первыми ДНК-вирусами, которые рассматривались в качестве потенциальных генных векторов в растениях, но их использование сначала было ограниченным из-за относительно небольших предельных размеров переносимых чужеродных генов.

Диссертационная работа Мардановой Евгении Сергеевны «Разработка систем экспрессии рекомбинантных белков в растениях на основе самореплицирующихся вирусных векторов и их применение для получения антигенов возбудителей инфекционных заболеваний» посвящена самому тщательному исследованию применения векторов на основе генома РНК-содержащего вируса растений. При этом вектор на базе ХВК использовали для экспрессии кандидатных вакцин против социально-значимых инфекций, включая грипп А, гепатит Е и короновиреус SARS-CoV-2.

Текст диссертации изложен на 241 странице текста и включает 109 рисунков и 12 таблиц. В список литературы включены 319 печатных работ. Работа имеет как явно сфокусированный в области медицинской вакцинологии, так и широко значимый характер в области биотехнологии растений. При этом сфокусирована она на разработке кандидатных вакцин против социально-значимых инфекций, а очевидно интересным для широкого круга биотехнологов растений является разработка набора высокоэффективных векторов, который автор использовал в своем исследовании.

Для понимания обоснованности выводов и логики диссертационной работы стоит кратко остановиться на ее содержании.

В обзоре литературы, изложенном на 62 страницах, автор диссертации самым подробным образом описывает имеющиеся в научной литературе данные по теме диссертации. В частности, в начале обзора рассматривается проблема использования растений как биофабрик. Описаны основные пути экспрессии чужеродных белков в растениях, включая получение трансгенных растений. Рассмотрены также более современные методы, базирующиеся на временной экспрессии целевых генов в составе вирусных векторов. Затем описаны главные цели введения и экспрессии чужеродных генов в растениях. В частности, к ним относятся задачи получения сельскохозяйственных растений с улучшенными свойствами, с одной стороны, и, с другой стороны, наработки съедобных вакцин, что позволяет избежать дорогостоящего этапа

выделения вакцинных белков. Кроме того, растения могут быть продуцентами широкого спектра белков и других соединений в терапевтических целях. В следующей части обзора подробно рассмотрена литературная информация о векторах на основе генома X-вируса картофеля. В последующих разделах детализированы данные о вирусах, служащих объектами для получения вакцин в данной работе. К ним относятся вирус гриппа, вирус гепатита E и SARS-CoV-2. Обзор очень подробный и энциклопедичный. Он абсолютно адекватен общему содержанию диссертации и подводит читателя к пониманию целей и задач диссертации. Следует отметить, что обзор прекрасно иллюстрирован, и имеющиеся в нем рисунки и таблицы значительно облегчают читателю понимание его содержания.

Глава материалы и методы исследования занимает 20 страниц и написана чрезвычайно подробно. Очевидно, что на основе этой главы последующие поколения научных сотрудников, аспирантов и студентов смогут воспользоваться почти всеми описанными методиками. Хочется отметить, что полученные в работе данные получали в нескольких экспериментальных системах *in vivo* и *in vitro*, используя генно-инженерные, микроскопические, иммунологические и биохимические методы.

В главе результаты диссертация содержит 5 разделов. В первом разделе описано создание новых экспрессионных векторов для растений на базе генома X-вируса картофеля. Для повышения эффективности векторных конструкций автор использовал несколько подходов. На первом этапе ранее описанный векторный ген ХВК был модифицирован с целью ускорения создания целевых конструкций. Для этого в векторный ген ввели уникальные сайты рестрикции, в частности SmaI, что дает возможность быстрой интеграции любых целевых генов по тупым концам. Кроме того, автором была проведена работа по уменьшению размера экспрессионного вектора, что, как было показано, способствует увеличению наработки целевого белка. Далее автор дополнительно оптимизировал экспрессионную

систему за счет повышения эффективности инициации трансляции целевого гена. Для этого в векторный геном была внедрена последовательность трансляционного энхансера из вируса мозаики люцерны, что позволило повысить уровень синтеза целевого белка в 3-4 раза. Дополнительным приемом для повышения эффективности продукции целевых белков созданной вирусной конструкцией стало подавление защитной системы сайленсинга в зараженном растении. При этом использовали ко-инфильтрацию с конструкцией, экспрессирующей супрессор сайленсинга, ген Р24 из вируса скручиваемости листьев винограда. Более того, заметным достижением автора явилось создание двух-кассетной конструкции, позволяющей вводить в растение ген супрессор и векторный геном без использования ко-инфильтрации. Важной стадией оптимизации векторной системы экспрессии на основе генома ХВК стало слияние кодирующей области целевого белка с растительным сигнальным пептидом и олигогистидиновым блоком. Это позволило стабилизировать целевой белок за счет его транспорта в эндоплазматический ретикулум, с одной стороны, и облегчить его очистку, с другой.

Последующие пять частей раздела Результаты имеют, на наш взгляд, значительное прикладное значение в области вакцинологии. Сначала автор описывает разработку растительной вакцины против вируса гриппа А на основе М2е пептида, слитого с ядерным антигеном вируса гепатита В. При этом автором решалась общая задача создания универсальной противогриппозной вакцины. Для этого было предложено использовать внешний пептид консервативного мембранного белка М2е, что само по себе уже продолжительное время рассматривается как традиционный подход. Однако, в связи с низкой иммуногенностью пептида продолжаются поиски наиболее эффективных носителей и адьювантов. Использование слитного белка М2ер-НВс позволило получить после экспрессии в растениях препарат вирусоподобных частиц, легко выделяемых осаждением сульфатом аммония. В ходе оценки протективного действия препаратов частиц М2ер-НВс

проводилось исследование на мышах, зараженных адаптированным штаммом вируса гриппа А. Показано, что иммунизация мышей препаратом вирусоподобных частиц обеспечивает формирование иммунитета против летальной гриппозной инфекции.

В дальнейших экспериментах автор использовал для создания вакцины пептид M2e, присоединенный к бактериальному флагеллину. Известно, что этот белок обладает выраженным адьювантным эффектом, являясь лигандом толл-подобного рецептора TLR5. Мультиплицированный белковый сегмент, содержащий 4 копии M2e, был слит с С-концом флагеллина, а созданную на базе генома ХВК конструкцию переносили в растения с помощью агроинфильтрации. При этом эффективность накопления потенциального иммуногена в клетках *Nicotiana benthamiana* составила 30% от суммарного растворимого белка. В результате интраназальная иммунизация мышей очищенным вакцинным белком на базе флагеллина приводила к индукции высоких титров M2e-специфичных антител и обеспечивала защиту животных против вируса гриппа. На следующем этапе работы автор усовершенствовал конструкцию с флагеллином за счет введения дополнительного иммуногена для вируса гриппа, представляющего собой фрагмент белка гемагглютинина. Этот белок входит в состав оболочки вируса и является основным иммуногеном для образования вирус-нейтрализующих антител. Очищенный из растений гибридный иммуноген, включающий флагеллин с присоединенным к нему фрагментом гемагглютинина и тетрамерной копии пептида M2e, эффективно защищает мышей при заражении гриппом А.

В следующем крупном блоке исследования автор изучил то, как капсидный белок вируса гепатита Е может быть использован для продукции в растениях комбинированного иммуногена против вируса гепатита Е (HEV), вируса гриппа и SARS-CoV-2. Выяснилось, что фрагмент капсидного белка HEV, а также его копии слитые с пептидом M2e и вирионным белком S коронавируса, способны формировать после экспрессии в растениях наночастицы размером около 30нм и более крупные агрегаты. Препараты

таких частиц обладали существенной иммуногенностью в мышах и вызывали образование специфических антител к вирусу гриппа, HEV и SARS. Более того, антитела, вырабатываемые у пациентов с SARS-19, эффективно связывают частицы, содержащие капсидный белок HEV, слитый с вирионным белком S коронавируса. На заключительном этапе работы автор сконструировал новый потенциальный иммуноген, несущий флагеллин с присоединенным пептидом M2e и фрагментом белка S коронавируса. Такой составной белок эффективно продуцировался в растениях, а слияние его с сигнальным пептидом приводило к транспорту в эндоплазматический ретикулум и последующему гликозилированию, что потенциально приближает структуру иммуногена к его природным вирусным аналогам.

Наконец, в заключительной части работы Обсуждение автор обобщает полученные результаты и сравнивает их с известными примерами из литературы.

Диссертационная работа в целом написана понятным языком, выверена и содержит малое количество опечаток. Экспериментальная часть выполнена на высоком научно-методическом уровне с использованием современных методов молекулярной биологии, биохимии, генетической инженерии и микроскопии. Интерпретация полученных результатов логична, аргументирована, научно обоснована и не вызывает сомнений.

Диссертационная работа Е.С. Мардановой не вызывает существенных замечаний. Однако следует отметить некоторые моменты.

Материалы и методы.

В разделе Материалы и методы отсутствует отдельная глава, посвященная использованным в работе материалам и реагентам. Использованные материалы и реагенты упоминаются лишь в разделах, посвященных описанию отдельных методов. Фирмы-производители указаны далеко не для всех упоминаемых материалов и реагентов.

Стр. 69. Метод трансформации агробактерий описан весьма поверхностно.

Стр. 81. Инструментальные методы исследования, включая электронную микроскопию, атомно-силовую микроскопию и динамическое светорассеяние описаны недостаточно подробно.

Результаты.

Стр. 115-117 (Рис. 4.2.7. и 4.2.8.), Стр. 132-134 (Рис. 4.3.16. и 4.3.17) и Стр. 141-142 (Рис. 4.4.6.). При рассмотрении результатов по протективности кандидатных вакцин не указано общее количество использованных в эксперименте животных. Для Рис. 4.2.7. и 4.2.8 вообще не представлены какие-либо статистические данные.

В разделе, посвященном описанию конструкции “флагеллин с присоединенным к нему фрагментом гемагглютинина и тетрамерной копии пептида M2e” хотелось бы видеть прямое сравнение ее эффективности с конструкцией флагеллин-тетрамер пептида M2e.

Хотелось бы видеть в этом разделе какие-либо данные об эффективности экспрессии использованных автором конструкций не только в *Nicotiana benthamiana*, но и в других лабораторных (табак, арабидопсис) или даже в съедобных растениях.

Обсуждение.

Стр. 184-185 и 195. Эти части Обсуждения скорее должны быть приведены в обзоре литературы.

Вместе с тем, указанные замечания не умаляют значимости диссертационного исследования. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В. Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует специальности 1.5.3. – молекулярная биология (по биологическим наукам), а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В. Ломоносова, а также оформлена согласно требованиям Положения о совете по защите диссертаций на соискание

ученой степени доктора наук Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова.

Таким образом, соискатель Марданова Евгения Сергеевна заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.3. – молекулярная биология.

Официальный оппонент:

доктор биологических наук, профессор, заведующий лабораторией генной инженерии вирусов отдела биохимии вирусов растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

МОРОЗОВ Сергей Юрьевич

12 марта 2024 г.

Контактные данные:

+7(495)9393198
morozov@genebee.msu.su

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена докторская диссертация:

03.00.03 – молекулярная биология

Адрес места работы:

119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, стр. 40.

НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Тел.: 939-53-59

Подпись сотрудника НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» Морозова С.Ю. удостоверяю:

руководитель/кадровый работник

дата:

И.О. Фамилия:

ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
ЗАВ. КАНЦЕЛЯРИЕЙ
Н.И. САДОРОВА

