

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО НАУЧНЫХ ОРГАНИЗАЦИЙ

Филиал Федерального государственного бюджетного учреждения
науки ИНСТИТУТА БИООРГАНИЧЕСКОЙ ХИМИИ им. академиков
М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук
(ФИБХ РАН)

142290, Российская Федерация, Московская область, город Пушкино, проспект Науки, д. 6
Тел.: +7(495) 625-23-42, +7 (4967) 73-17-19, Факс: +7 (4967) 33-05-27 Эл. почта: fibkh@bibch.ru,
www.bibc.psn.ru

ИНН/ КПП 7728045419/ 503902001, ОГРН 1037739009110

№ _____

«Утверждаю»

зам. директора ИБХ РАН

академик

А.И. Мирошников

« 1 » марта 2016 г.



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук
(ФИБХ РАН)

Диссертационная работа Тарасенко Ирины Викторовны «Разработка растительной экспрессионной платформы для получения субстанций ветеринарного назначения на примере пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1» выполнена в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) ФИБХ РАН.

В период подготовки диссертации соискатель Тарасенко Ирина Викторовна работала в Филиале Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН) в лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) в должности младшего научного сотрудника.

В 2011 г. Тарасенко И.В. окончила аспирантуру Федерального государственного бюджетного научного учреждения Всероссийского научно-исследовательского института сельскохозяйственной биотехнологии (ФГБНУ

ВНИИСБ) по специальности 03.00.03 – молекулярная биология, и успешно сдала следующие кандидатские экзамены: «История и философия науки (биологические науки)», «Иностранный язык (английский)», «Биотехнология (в том числе бионанотехнологии)». Удостоверение о сдаче кандидатских экзаменов № 143 выдано в 2014 г. Федеральным государственным бюджетным научным учреждением Всероссийским научно-исследовательским институтом сельскохозяйственной биотехнологии (ФГБНУ ВНИИСБ).

Научный руководитель – кандидат биологических наук по специальности 03.00.12 – «физиология и биохимия растений» Фирсов Алексей Петрович, старший научный сотрудник лаборатории экспрессионных систем и модификации генома растений (Биотрон) Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН). Тема диссертации «Разработка растительной экспрессионной платформы для получения субстанций ветеринарного назначения на примере пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1» была утверждена на заседании ученого совета ИБХ РАН (протокол №5 от 21 мая 2014 г.).

По результатам рассмотрения диссертации «Разработка растительной экспрессионной платформы для получения субстанций ветеринарного назначения на примере пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1» принято следующее заключение:

Актуальность темы диссертационной работы обусловлена важностью использования растительных систем в качестве биофабрик по производству фармацевтически значимых белков. Хорошей альтернативой традиционным вакцинам являются «съедобные» вакцины, полученные на основе различных растительных экспрессионных платформ и позволяющие существенно снизить затраты на всех этапах вакцинации, что особенно важно применительно к задачам сельскохозяйственного производства. Перспективным направлением в создании противогриппозных вакцин может стать рекомбинантная вакцина на основе высоко консервативного пептида M2e белка M2 вируса гриппа. Проблема получения съедобной вакцины растительного происхождения против вируса гриппа птиц широкого спектра действия является актуальной как для практического применения, так и с точки зрения развития фундаментальных аспектов молекулярной биотехнологии. Диссертационная работа Тарасенко И.В. является законченным научным исследованием, научно-квалификационной работой, целью которой являлась разработка растительной экспрессионной системы для получения вакцинных белков ветеринарного назначения на примере пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1.

Личное участие соискателя состоит в непосредственном планировании и выполнении экспериментов, анализе полученных данных и их оформлении для публикаций. Подавляющая часть экспериментальной работы выполнена Тарасенко И.В. самостоятельно. Все генетические конструкции и трансгенные растения табака, использованные в работе, получены лично автором. И.В. Тарасенко самостоятельно выполняла молекулярно-биологический анализ трансгенных растений. Теоретический анализ полученных результатов И.В. Тарасенко проводила совместно с научным руководителем диссертационной работы.

Достоверность результатов исследований, проведенных соискателем, подтверждается применением в работе современных методов исследований и использованием сертифицированного оборудования для измерений

Научная новизна работы. Данная работа посвящена разработке подхода к получению вакцины против гриппа птиц широкого спектра действия на основе растительных платформ. Диссертантом был изучен характер экспрессии синтетического 5'-концевого фрагмента гена M2 вируса гриппа птиц H5N1, включающего пептид M2e, с оптимизированным для растений кодонным составом в трансгенных растениях. Впервые были получены трансгенные растения табака и ряски стабильно экспрессирующие последовательность пептида M2e. Были показаны различия в экспрессии M2e в составе N-концевых фрагментов белка M2 вируса гриппа птиц H5N1 разной длины в трансляционном слиянии с β -глюкуронидазой в трансгенных растениях табака. Было показано, что оптимальными для экспрессии в растениях являются фрагменты длиной 30 а.о. (M130) и 22 а.о. (M122), тогда как экспрессия фрагмента в 43 а.о. (M143) в составе слитого белка прекращается в процессе культивирования.

Для последующего использования в качестве мукозального адьюванта диссертантом была клонирована последовательность субъединицы Б рицина (RTB) из местного сорта клещевины (*Ricinus communis*), проведенный анализ нуклеотидной и аминокислотной последовательностей показал идентичность клонированной RTB последовательностям, депонированным в базе данных GeneBank. Полученная последовательность RTB была клонирована в трансляционном слиянии с пептидом M2e. Было показано, что в трансгенных растениях табака и ряски в составе слитого с пептидом M2e белка рекомбинантная субъединица Б рицина сохраняла способность связывания с галактозосодержащими субстратами, что указывало на корректность посттрансляционных модификаций и сохранение её адьювантных свойств. Был проведен количественный анализ накопления слитых белков M130- β – глюкуронидаза и RTB-M130 в трансгенных растениях. Было показано, что уровень накопления M130- β – глюкуронидаза в трансгенных растениях ряски значительно превосходил таковой в растениях табака, тогда как накопление RTB-M130 достоверно не отличалось в двух изученных экспрессионных системах. Исходя из полученных данных, диссертант

сделал вывод о возможности использования растений табака и ряски в качестве биосинтетических платформ для наработки пептида М2е слитого с β-глюкуронидазой или субъединицей В рицина.

Практическая значимость полученных результатов. Проведенная диссертантом работа позволила отобрать оптимальный для экспрессии в растениях табака и ряски 5'-концевой фрагмент гена М2 вируса гриппа птиц H5N1, включающий пептид М2е. В результате были получены линии стабильно трансформированных трансгенных растений табака и ряски, синтезирующих пептид М2е вируса гриппа птиц H5N1, слитый с β-глюкуронидазой и субъединицей В рицина, которые могут быть использованы как экспрессионные платформы для получения соответствующих вакцинных белков. Полученные результаты будут использованы в дальнейших исследованиях по разработке съедобной противогриппозной вакцины широкого спектра действия ветеринарного назначения.

Диссертация соответствует требованиям, предъявляемым «Положением о порядке присуждения ученых степеней» к диссертациям на соискание ученой степени кандидата наук. Опубликованные материалы и автореферат достаточно полно отражают основное содержание диссертации.

Диссертационная работа Тарасенко Ирины Викторовны «Разработка растительной экспрессионной платформы для получения субстанций ветеринарного назначения на примере пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1» соответствует специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Основные результаты работы, полученные автором, опубликованы в научных журналах, рекомендованных ВАК, а также представлены на российских и международных конференциях.

Список публикаций по теме диссертации.

Публикации в рецензируемых журналах:

1. Тарасенко И.В., Таранов А.И., Фирсов А. П., Долгов С.В. Экспрессия нуклеотидной последовательности пептида М2е вируса гриппа птиц в трансгенных растениях табака. Биотехнология, 2012, № 4, стр. 18-25.
2. Фирсов А.П., Тарасенко И.В., Пушин А.С., Шалойко Л.А., Винокуров Л.М., Долгов С.В. Экспрессия пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансгенных растениях табака в трансляционном слиянии с субъединицей В рицина. Биотехнология, 2015, №2, стр. 55-64.
3. Firsov A., Tarasenko I., Mitiouchkina T., Ismailova N., Shaloiko L., Vainstein A., Dolgov S. High-yield expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1

in transgenic duckweed plants. *Molecular Biotechnology*, 2015, Volume 57, Issue 7, pp 653-661.

Материалы научных конференций и тезисы докладов:

1. Firsov A.P., **Tarasenko I.V.**, Dolgov S.V. "Expression of the avian influenza virus H5N1 M2e peptide fused with β -glucuronidase in transgenic tobacco plants." The Third International Conference PLANT EXPRESSION SYSTEMS FOR PHARMACOLOGICS, 2009, Univeversity of Verona, Italy
2. **Тарасенко И.В.**, Таранов А.И., Фирсов А.П., Долгов С.В. «Экспрессия пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в растениях для создания универсальной съедобной вакцины», 15-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, Пущино, 2011
3. **Тарасенко И.В.**, Таранов А.И., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В. «Экспрессия пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в растениях ряски малой (*LEMNA MINOR*) для создания универсальной противогриппозной съедобной вакцины.» X чтения памяти академика Ю.А. Овчинникова, Москва, 14-17 ноября 2011
4. **Тарасенко И.В.**, Гиляшова Н.В., Фирсов А.П., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В. Экспрессия слитого гена субъединицы В рицина (*Ricinus communis*) с геном пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансгенных растениях ряски (*Lemna minor*). Всероссийская молодежная конференция «Актуальные проблемы химии и биологии», Пущино, 2012, стр. 101-102
5. **Тарасенко И.В.**, Фирсов А.П., Гиляшова Н.В., Митюшкина Т.Ю., Долгов С.В. Экспрессия синтетического гена пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в растениях. // Международная научно-практическая конференция «Клеточная биология и биотехнология растений», г. Минск, 13-15 февраля 2013, стр.237
6. **Tarasenco I.V.**, Firsov A.P., Dolgov S.V. Analysis of transgenic tobacco plants containing the nucleotide sequence of M2e of the avian influenza virus H5N1 in translation fusion with the gene B subunit of ricin castor (*Ricinus communis*). // 17-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых, г.Пущино, 21-26 апреля 2013, стр. 368
7. **Тарасенко И.В.**, А.П. Фирсов, С.В. Долгов. Анализ экспрессии 5'-концевой последовательности пептида М2е вируса гриппа птиц H5N1 в трансляционном слиянии с геном субъединицы Б рицина клещевины (*Ricinus communis*) в трансгенных растениях табака. // V Международная научно-

- практическая конференция «Актуальные проблемы биологии, нанотехнологий и медицины», г. Ростов-на-Дону, 3–5 октября 2013, стр. 184.
8. Firsov A.P., **Tarasenko I.V.**, Mitiouchkina, T.Y., Gyliashova N.V., Dolgov S.V. The expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in translational fusion with subunit B of ricin in the transgenic tobacco and duckweed plants.// Международная научная конференция по биологии и биотехнологии растений, г. Алматы, Казахстан, 28-30 мая 2014, стр.202.
9. Firsov A.P., **Tarasenko I.V.**, Mitiouchkina T.Y., Gilyashova N.V., Dolgov S.V. The expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in translational fusion with subunit B of ricin in the transgenic tobacco and duckweed plants.// MUCOSAL VACCINES ADJUVANTS & DELIVERY 2013 Conference, 25-27 September 2013, Copenhagen, Denmark
10. Firsov A.P., **Tarasenko I.V.**, Mitiouchkina T.Y., Gilyashova N.V., Dolgov S.V. The expression of M2e peptide of avian influenza virus H5N1 in translational fusion with subunit B of ricin in the transgenic duckweed plants.// International association for plant biotechnology congress 2014, Melbourne, Australia, 10-15 august 2014.

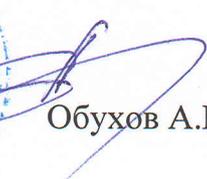
Диссертационная работа Тарасенко Ирины Викторовны «Разработка растительной экспрессионной платформы для получения субстанций ветеринарного назначения на примере пептида M2e вируса гриппа птиц H5N1» рассмотрена на заседании межлабораторного научного коллоквиума Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН) 28 ноября 2014 г., и **рекомендована к защите** на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 - биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Заключение принято на заседании межлабораторного научного коллоквиума Филиала Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ФИБХ РАН).

Присутствовало на заседании 21 чел. Результаты голосования «за» - 21 чел., «против» - 0 чел., «воздержались» - 0 чел., протокол №100 от 28 ноября 2014 г.

Секретарь коллоквиума
к.х.н.




Обухов А.Н.