State of Israel / Ministry of Agriculture
Agricultural Research Organization

The Volcani Center
Institute of Plant Protection
Plant pathology Department
And Weed Research
Dr. Munir Mawassi
mawassi@volcani.agri.gov.il
Fax: 972-3-9683768

מינהל המחקר החקלאי
המכון להגנת הצומח
המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר עשבים
ד"ר מוניר מוואסי
נייד: 050-6220376
Tel: 03-9683844

April 3, 2019

Review report on PhD thesis of Gritsenko Dilyara

entiteled

«DEVELOPMENT OF VIRAL VECTOR FOR EXPRESSION OF HETEROLOGOUS PROTEINS IN PLANTS AND INVESTIGATION OF THEIR EXPRESSION EFFICIENCY».

The grapevine crop is exposed to the attack of various pathogens, including viruses. Because grapevines are among the most economically important fruit crops and a highly valuable agricultural commodity, viruses have become one of the main research interests of many laboratories worldwide. Species of the families *Comoviridae* and *Closteroviridae* are the most represented and studied, whereas those of the genus Vitivirus, in the recently established *Betaflexiviridae* family, are less studied. Such species include Grapevine virus A (GVA), Grapevine virus B (GVB), Grapevine virus D (GVD) and Heracleum latent virus (HLV). GVA is closely associated with the rugose-wood disease complex of grapevine. A more detailed investigation of these viruses would make it possible to use them more extensively in both practical and theoretical terms. Currently, plant viruses are actively used for the transient expression of recombinant proteins in plants. The obtaining of heterologous proteins using vectors based on viral genomes is relevant for a number of reasons. The most important are obtaining a large amount of the target protein and flexibility of vector engineering. The advantages of using plants for expression of recombinant proteins are the ability to obtain a target protein that is free of animal pathogens, the presence of necessary post-translational modifications of proteins, the low cost of plant cultivation and the possibility of rapid scale-up of production. In addition to practical significance, viral vectors are very important tools for studying the molecular biology of pathogen and host interactions and the functional genomics of plants. At the moment, the main known commercial vectors are based on the genomes

State of Israel / Ministry of Agriculture
Agricultural Research Organization

The Volcani Center
Institute of Plant Protection
Plant pathology Department
And Weed Research
Dr. Munir Mawassi
mawassi@volcani.agri.gov.il
Fax: 972-3-9683768

מינהל המחקר החקלאי
המכון להגנת הצומח
המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר עשבים
ד"ר מוניר מוואסי
נייד : 050-6220376
Tel: 03-9683844

of the Tobacco mosaic virus, Potato virus X, Alfalfa mosaic virus and Cowpea mosaic virus. Using virus vectors for transient expression in plants, the following proteins were obtained: 1.2 g / kg -somatotropin; 5.1 g / kg - interferon alfa; 5.4 g / kg -various bacterial antigens; 0.3-1.0 g / kg - aprotinin, 2.0 g / kg -thaumatin, 2.5 g / kg SB- griffithsin. The most famous companies in obtaining recombinant proteins in plants using viral vectors are Icon Genetics and Nomad Bioscience.

The development of a vector based on the GVA genome by insertion of heterologous genes under the control of the ORF4 subgenomic promoter has not been previously carried out. Dilyara, for the first time, made the insertion of heterologous genes under the control of the subgenomic promoter of GVA capsid protein. Dilyara has developed two vectors, one vector - was developed by insertion of an additional gene into the genome of the virus, between ORF4 and ORF5, the second vector- was developed by replacing ORF4 with a heterologous gene. The viral vectors were studied by expression of the gene encoding the capsid protein of Apple chlorotic leafspot virus and by expression of the eGFP gene in Nicotiana benthamiana plants. The efficiency of expression of heterologous genes was analyzed by examining their transcription and translation. It was shown that the recombinant protein is successfully expressed in non-transgenic plants for the first vector and in transgenic plants carrying the capsid protein of GVA for the second vector. The lack of expression of GVA capsid protein in the second viral vector results in the accumulation of a small amount of genomic and subgenomic RNA, as well as the heterologous protein. In this work, it is assumed that low expression of the recombinant protein is due to the fact that the virus is unable to move in non-encapsidated form. The use of a vector with the replacement of ORF4 is possible only with the recovering of GVA capsid protein expression in trans-systems. The advantages of the developed vectors lie in the possibility of expression of recombinant proteins at the level of capsid protein expression of unmodified GVA. By deletion of viral genes, it is possible to insert extended heterologous genes such as 2-A peptides that are important for the development of vaccines. In addition, developed viral vectors can be used to

State of Israel / Ministry of Agriculture
Agricultural Research Organization

The Volcani Center
Institute of Plant Protection
Plant pathology Department
And Weed Research
Dr. Munir Mawassi
mawassi@volcani.agri.gov.il
Fax: 972-3-9683768

מינהל המחקר החקלאי
המכון להגנת הצומח
המחלקה לפתולוגיה של צמחים וחקר עשבים
ד"ר מוניר מוואסי
נייד : 050-6220376
Tel: 03-9683844

investigate the functional genomics of grapevine cultivars. Yet, the disadvantage of the using of a vector based on the complete GVA genome is the possibility to insertv genes of limited length, since a stable viral particle is disrupted with large insert. The disadvantage of the viral vector with the replacement of ORF4 is the need to use transgenic plants to increase the expression level of recombinant protein; however this technique is generally accepted. The work is complex, since the modification of the genome with overlapping reading frames is complicated, the modification of overlapping regions leads in most cases to disruption of the viral activity. All experiments are well arranged and measurements techniques and methods are correctly applied. It is generally well presented and interesting to read. The explanations are suitable and focused on the relevant topics.

In my opinion, the reviewed thesis fulfills all requirements posed on theses aimed for obtaining PhD degree. This thesis is ready to be defended orally, in front of respective committee.

Munir Mawassi

Dr. Munir Mawassi
Plant Pathology Department-Virology
Agricultural Research Organization-Volcani Center

Dr Munir Mawassi, Ph.D.
Department of Plant Pathology and Weed Research
Agricultural Research Organization, The Volcani Center
HaMaccabim Road 68.
POB 15159
Rishon LeZion 7505101
Israel
Email: mawassi@agri.gov.il

Agricultural Research Organization
VOLCANI CENTER
INSTITUTE of PLANT PROTECTION
P.O.B. 6 BET-DAGAN, ISRAEL

Перевод с английского языка на русский язык

Государство Израиль / Министерство сельского хозяйства
Организация сельскохозяйственных исследований

Центр "Volcani"
Институт защиты растений
Кафедра патологии растений и
борьбы с сорняками
Доктор Мунир Мавасси
mawassi@volcani.agri.gov.il
Факс: 972-3-9683768

3 апреля 2019 года

Экспертный отзыв на докторскую диссертацию Гриценко Диляры

на тему:

«СОЗДАНИЕ ВИРУСНОГО ВЕКТОРА ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ В РАСТЕНИЯХ И ИССЛЕДОВАНИЕ ЭФФЕКТИВНОСТИ ИХ ЭКСПРЕССИИ».

Культурный виноград подвергается агрессивному воздействию различных патогенных факторов, в том числе вирусов. Поскольку культурный виноград входит в число наиболее экономически важных плодовых культур и чрезвычайно ценных сельскохозяйственных продуктов, вирусы представляют особый интерес для исследования во многих лабораториях по всему миру. Наиболее описанными и изученными являются виды семейств *Comoviridae* и *Closteroviridae*, тогда как виды рода Vitivirus недавно выявленного семейства *Betaflexiviridae* изучены в меньшей степени. Среди таких видов можно назвать вирус А винограда (GVA), вирус В винограда (GVB), вирус D винограда GVD и латентный вирус борщевика (HLV). GVA тесно связан с комплексом бороздчатости винограда. Более детальное исследование этих вирусов дало бы возможность более широкого их использования как на практике, так и в теории. В настоящее время для транзиентной экспрессии рекомбинантных белков в растениях активно применяют вирусы растений. Получение гетерологичных белков с использованием векторов на основе вирусных геномов актуально по многим причинам. Наиболее важными из них являются: получение целевых белков в большом количестве, пластичность векторной инженерии. Преимуществами использования растений для экспрессии рекомбинантных белков являются: способность получения целевого белка без патогенных факторов животного происхождения, наличие посттрансляционных модификаций белков, низкая себестоимость культивирования растений и возможность быстрого увеличения продуктивности. В дополнение к практической значимости вирусные векторы являются весьма важным инструментом для изучения молекулярной биологии взаимодействий патоген-хозяин, функциональной геномики растений. На сегодняшний день известны только коммерческие векторы, разработанные на основе генома вируса табачной мозаики, Х-вируса картофеля, вируса мозаики люцерны и вируса

Государство Израиль / Министерство сельского хозяйства
Организация сельскохозяйственных исследований

Центр "Volcani"
Институт защиты растений
Кафедра патологии растений и
борьбы с сорняками
Доктор Мунир Мавасси
mawassi@volcani.agri.gov.il
Факс: 972-3-9683768

мозаики коровьего гороха. При помощи транзиентной экспрессии в растениях были получены следующие белки: 1,2 г/кг – соматотропин; 5,1 г/кг – интерферон альфа; 5,4 г/кг – различные бактериальные антигены; 0,3-1,0 г/кг – апротинин; 2,0 г/кг – тауматин; 2,5 г/кг – SB-гриффитсин. Наиболее известными компаниями, работающими в области получения рекомбинантных белков в растениях при помощи вирусных векторов, являются: "Icon Genetics" и "Nomad Bioscience".

Разработка вектора на основе генома GVA путём вставки гетерологичного гена под контролем субгеномного промотора ORC4 ранее не проводилась. Диляра впервые произвела вставку гетерологичных генов под контролем субгеномного промотора капсидного белка GVA. Диляра разработала два вектора, один – путём вставки дополнительного гена в геном вируса между ORC4 и ORC5, и второй – путём замены ORC4 на гетерологичный ген. Изучение вирусных векторов проводилось при помощи экспрессии генов, кодирующих капсидный белок вируса хлоротической пятнистости листьев яблони, а также экспрессии гена усиленного зеленого флуоресцентного белка. Анализ эффективности экспрессии гетерологичных генов проводился по транскрипции и трансляции. Было показано, что первый вектор обеспечивает успешную экспрессию рекомбинантного белка в нетрансгенных растениях, а второй вектор в трансгенных растениях, содержащих капсидный белок GVA. Недостаточная экспрессия капсидного белка GVA в случае второго вирусного вектора приводит к аккумуляции небольшого количества геномной, субгеномной РНК, а также гетерологичного белка. В данной работе автор предполагает, что низкая экспрессия рекомбинантного белка является следствием того факта, что неинкапсидированная форма вируса не способна передвигаться в отсутствии физической защиты генома, капсидный белок GVA принимает участие в супрессии РНК-интерференции. Использование вектора с заменой ORC4 возможно только с восстановлением экспрессии капсидного белка GVA в транс-системах. Преимущества разработанных векторов заключаются в возможности экспрессии рекомбинантных белков на уровне экспрессии капсидного белка немодифицированного GVA. Делеция вирусных генов даёт возможность вставки длинных гетерологичных генов, пептиды 2-А дают возможность получить экспрессию сложных белков, что имеет важное значение для разработки вакцин. Кроме того, разработанные вирусные векторы можно использовать для исследования функциональной геномики культурных сортов винограда. Недостатком вектора, разработанного на основе полного генома GVA, является ограничение длины генов, которые возможно вставить, поскольку вставка большого участка ДНК разрушает стабильную вирусную частицу. Недостатком вирусного вектора с заменой ORC4 является необходимость получения трансгенных растений для повышения уровня экспрессии

Государство Израиль / Министерство сельского хозяйства
Организация сельскохозяйственных исследований

Центр "Volcani"
Институт защиты растений
Кафедра патологии растений и
борьбы с сорняками
Доктор Мунир Мавасси
mawassi@volcani.agri.gov.il
Факс: 972-3-9683768

рекомбинантного белка; впрочем, это общепринятый метод. Данная работа является сложной, поскольку модификация генома с перекрывающимися рамками считывания представляет собой трудную задачу, модификация перекрывающихся областей в большинстве случаев вызывает нарушение активности вируса. Все экспериментальные исследования хорошо продуманы, методы измерений применены корректно. В целом работа хорошо изложена и вызывает интерес. Приведены адекватные пояснения с концентрацией на актуальных темах.

На мой взгляд, рассматриваемая диссертация соответствует всем требованиям, установленным для диссертаций на соискание ученой степени доктора наук. Данная диссертация подготовлена для защиты в устной форме перед соответствующей комиссией.

/Факсимильная подпись/

Мунир Мавасси, Ph.D.
Адрес: Maccabim Road 68.
POB 15159
Rishon LeZion 7505101
Израиль
Email: mawassi@agri.gov.il

/Штамп/: Доктор Мунир Мавасси
Кафедра патологии растений и борьбы с сорняками,
Организация сельскохозяйственных исследований,
Центр "Volcani"

/Штамп/: Организация сельскохозяйственных исследований,
Центр "Volcani"
Институт защиты растений
P.O.B. 6 Bet-Dagan, Израиль

Содержание настоящего документа переведено с английского языка на русский язык дипломированным переводчиком Бюро переводов “Accord Translation” Пак Ириной Гербертовной, 07.06.1973 года рождения, уроженкой г. Алматы, ИИН 730607400315, свидетельство ИП 6004 № 0010419. Правильность перевода текста и его соответствие исходному тексту настоящим подтверждаю.

Подпись: Пак Ирина Гербертовна

Пак И.Г. БЮРО ПЕРЕВОДОВ "ACCORD TRANSLATION" ИНДИВИДУАЛЬНЫЙ ПРЕДПРИНИМАТЕЛЬ

Четвертое мая две тысячи девятнадцатого года, город Алматы, Республика Казахстан.
Я, Ешмухамбетова Салима Хасановна нотариус города Алматы, действующий на основании лицензии № 13017624, выданной 14 ноября 2013 года Комитетом регистрационной службы и оказания правовой помощи Министерства юстиции Республики Казахстан, свидетельствую подлинность подписи переводчика Пак Ирины Гербертовны, выполнившей перевод содержания настоящего документа. Личность переводчика установлена, дееспособность и полномочия проверены.

Зарегистрировано в реестре за № 1333
Взыскано в соответствии со ст. 30-1 Закона РК «О нотариате»

Нотариус

Нотариус

Нөмірленген және бауырықталған
Пронумеровано и прошнуровано
парақтарға/страницах