

Облікова картка дисертації

I. Загальні відомості

Державний обліковий номер: 0421U104094

Особливі позначки: відкрита

Дата реєстрації: 29-12-2021

Статус: Захищена

Реквізити наказу МОН / наказу закладу:



II. Відомості про здобувача

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Похоленко Яніна Олександрівна

2. Pokholenko Ianina Oleksandrivna

Кваліфікація:

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Вид дисертації: кандидат наук

Аспірантура/Докторантура: так

Шифр наукової спеціальності: 03.00.22

Назва наукової спеціальності: Молекулярна генетика

Галузь / галузі знань: Не застосовується

Освітньо-наукова програма зі спеціальності: Не застосовується

Дата захисту: 21-12-2021

Спеціальність за освітою: біологія

Місце роботи здобувача: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, м. Київ, 03143, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

III. Відомості про організацію, де відбувся захист

Шифр спеціалізованої вченої ради (разової спеціалізованої вченої ради): Д 26.237.01

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, м. Київ, 03143, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

IV. Відомості про підприємство, установу, організацію, в якій було виконано дисертацію

Повне найменування юридичної особи: Інститут молекулярної біології і генетики Національної академії наук України

Код за ЄДРПОУ: 05417101

Місцезнаходження: вул. Академіка Заболотного, буд. 150, м. Київ, 03143, Україна

Форма власності:

Сфера управління: Національна академія наук України

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

V. Відомості про дисертацію

Мова дисертації:

Коди тематичних рубрик: 34.15.23

Тема дисертації:

1. Конструювання модельної ДНК-вакцини та шляхи посилення її імуногенних властивостей
2. Construction of model DNA-vaccine and ways to enhance its immunogenic properties

Реферат:

1. Дисертаційна робота присвячена розробці підходів до посилення імуногенності рекомбінантних плазмідних конструкцій, які містять химерний ген E2 глікопротеїна вірусу класичної чуми свиней, шляхом оптимізації складу модельної маркованої ДНК-вакцини. В ході виконання роботи було створено серію рекомбінантних плазмід, які містять химерні гени на основі SacI-EcoRI фрагменту E2 вірусу класичної чуми свиней під транскрипційним контролем промотору/енхансеру ранніх генів цитомегаловірусу людини у складі евкаріотичної еспресійної касети, що розташована між інвертованими термінальними повторами адено-асоційованого вірусу -2 людини (ITR AAV-2). В транзиторній системі експресії показано, що введення до складу рекомбінантного вектору послідовностей ITR AAV-2 призводить до збільшення накопичення химерного антигену на основі E2 ВКЧС в трансфікованих клітинах лінії HEK293. Так для клітин лінії HEK293, які були трансфіковані pTR-EGFP/E2 на третю добу після трансфекції показано експресію химерного

EGFP/E2 на рівні $\sim 113 \pm 21$ нг/105 кл/72 год, в той час як для клітин, трансфікованих плазмідом рEGFP/E2 - $\sim 15 \pm 3.7$ нг/105 кл/72 год. Варто зауважити, що різниця рівнів експресії химерного білка EGFP/E2, що спостерігалася при трансфекції клітин лінії HEK293 плазмідами рTR-EGFP/E2 та рEGFP-E2, не була наслідком пригнічення метаболічної активності клітин за рахунок більшої цитотоксичності препаратів ДНК/ПЕІ, чи цитотоксичного впливу експресії химерного протеїну. Продемонстровано, що введення ITR AAV-2 у плазмідний вектор не впливало суттєво на тривалість експресії та персистенції трансгену у клітинах HEK293 за умови відсутності селективного тиску. Виявлено, що створені рекомбінантні плазмідні конструкції рTR-BKneo- та рBS-BK здатні індукувати продукцію специфічних до фрагменту E2 ВКЧС антитіл у мишей. Вперше продемонстровано, що введення до складу векторної конструкції модельної маркованої ДНК-вакцини проти КЧС послідовностей ITR AAV-2 призводить до збільшення як інтенсивності, так і тривалості гуморальної імунної відповіді на імунізацію. Відомо, що застосування гетерологічної бустерної вакцинації може значно посилити імуногенність кандидатних вакцинних препаратів, а також дозволить знизити їх реактогенність та ймовірність розвитку імунної відповіді на вектор. Отримані нами дані свідчать про те, що бустерна імунізація фрагментом рекомбінантного білка E2 ВКЧС після дворазової імунізації плазмідним вектором рTR-BKneo- призводить до значного посилення синтезу антитіл до цільового антигену порівняно з триразовим введенням рTR-BKneo-. Однією з перспективних стратегій посилення імунної відповіді на ДНК-вакцинацію, яка розглядається останнім часом, є введення до складу вакцинного препарату так званих «генних ад'ювантів» - рекомбінантних векторів, які несуть гени цитокінів, хемокінів чи ко-стимуляторних молекул. В рамках цієї роботи ми створили рекомбінантні конструкції рmIL12-TR та рmIL2-TR, які містять гени інтерлейкіну-12 та інтерлейкіну-2 миші відповідно, під транскрипційним контролем промотору/енхансеру ранніх генів цитомегаловірусу людини у складі експресійної касети розташованої між ITR AAV-2. А також їх похідні рTR-mIL2/EGFP та рTR-mIL2/EGFP, які містять ген химерного білка IL2/EGFP та IL12/EGFP відповідно. Дослідження функціональної активності створених векторів *in vitro* продемонструвало, що химерні білки експресуються зі створених рекомбінантних конструкцій у клітинах лінії HEK293, та частково секретиуються з клітин у культивацийне середовище. В досліді *in vivo* було доведено, що комбіноване введення рTR-BKneo- та генів інтерлейкіну-2 та химерного інтерлейкіну-12 миші у складі створених рекомбінантних конструкцій посилює гуморальну імунну відповідь на E2 ВКЧС. Показано, що ефект посилення найбільш виражений у групі тварин, яким вводили по 10 мкг рmIL12-TR та рmIL2-TR у комбінації з рTR-BKneo-.

2. The thesis is devoted to developing approaches to enhance the immunogenicity of recombinant plasmid constructs containing the chimeric gene for the E2 glycoprotein of classical swine fever virus by optimizing the composition of model marker DNA vaccine. A series of recombinant plasmids was created, containing chimeric genes based on the SacI-EcoRI fragment of the E2 fragment of classical swine fever virus, placed under the transcriptional control of the promoter/enhancer of early/immediate genes of human cytomegalovirus in the eukaryotic cassette, and located between inverted terminal repeats of human adeno-associated virus-2 (ITR AAV-2). In a transient expression system, it was demonstrated that the introduction of ITR AAV-2 sequences into the recombinant vector leads to an increase in the accumulation of chimeric antigen in transfected cells of the HEK293 line. The amount of EGFP/E2 in the cells transfected with plasmid рTR-EGFP/E2 was $\sim 113 \pm 21$ ng per 105 viable cells per 72 h, while transfecting cells with plasmid рEGFP/E2 was $\sim 15 \pm 3$ ng per 105 viable cells per 72 h. It should be noted that the observed difference in the expression levels of the protein was not due to the decrease in metabolic activity of cells or more significant cytotoxicity of the рEGFP/E2 and polyethyleneimine complexes. We demonstrated that the introduction of ITR AAV-2 into the plasmid vector did not significantly affect the duration of expression and persistence of the transgene in HEK293 cells in the absence of selective pressure. It was found that the recombinant plasmid constructs рTR-BKneo- and рBS-BK can induce the production of antibodies specific to the E2 fragment CSFV in mice. For the first time, it has been demonstrated that the introduction of ITR AAV-2 sequences into the vector construct of a model marker DNA vaccine against CSF leads to an increase in both the intensity and duration of the humoral immune response to immunization. The use of heterologous booster vaccination could significantly increase the immunogenicity of candidate vaccines, reduce their

reactogenicity, and the likelihood of the development of an immune response to the vector. Our data indicate that booster immunization with a recombinant fragment of the E2 protein of CSFV performed after double immunizations with the plasmid vector pTR-BKneo- leads to a significant increase in the synthesis of antibodies specific to the target antigen, compared with three injections of pTR-BKneo-. One of the promising strategies to enhance the immune response to DNA vaccination, which has been considered recently, is the introduction of so-called "gene adjuvants" - recombinant vectors that carry genes encoding cytokines, chemokines, or co-stimulatory molecules. In this work, we created recombinant constructs pmIL12-TR and pmIL2-TR, which contain mouse genes interleukin-12 and interleukin-2, respectively, under the transcriptional control of the promoter/enhancer of early/immediate human cytomegalovirus genes in the expression cassette located between ITR AAV-2. We also created their derivatives pTR-mIL2 / EGFP and pTR-mIL2 / EGFP, which contain the chimeric genes of IL2 / EGFP and IL12 / EGFP proteins. In vitro study of the functional activity of the generated vectors showed that chimeric proteins are expressed from the generated recombinant constructs in HEK293 cells and are partially secreted from the cells into the conditioned medium. The combined administration of pTR-BKneo- and genes of murine interleukin-2 and chimeric interleukin-12 in the created recombinant constructs enhances the humoral immune response to E2 CSFV. Moreover, the enhancement effect is the most pronounced in the group of animals that received 10 µg of pmIL12-TR and pmIL2-TR in combination with pTR-BKneo-.

Державний реєстраційний номер ДіР:

Пріоритетний напрям розвитку науки і техніки:

Стратегічний пріоритетний напрям інноваційної діяльності:

Підсумки дослідження:

Публікації:

Наукова (науково-технічна) продукція:

Соціально-економічна спрямованість:

Охоронні документи на ОПІВ:

Впровадження результатів дисертації:

Зв'язок з науковими темами:

VI. Відомості про наукового керівника/керівників (консультанта)

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Кордюм Віталій Арнольдович
2. Kordium Vitalii Arnoldovitch

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.03, 03.00.20

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VII. Відомості про офіційних опонентів та рецензентів

Офіційні опоненти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Ольхович Наталія Вікторівна
2. Olkhovych Natalia V.

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.22

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Скок Марина Володимирівна
2. Skok Maryna Volodymyrivna

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.04, 03.00.04

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Рецензенти

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Півень Оксана Олександрівна
2. Piven Oksana Oleksandrivna

Кваліфікація: д. б. н., 03.00.22

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

Власне Прізвище Ім'я По-батькові:

1. Гарманчук Людмила Василівна

2. Garmanchuk Liudmyla Vasilevha

Кваліфікація: д.б.н., 03.00.04, 03.00.11

Ідентифікатор ORCID ID: Не застосовується

Додаткова інформація:

Повне найменування юридичної особи:

Код за ЄДРПОУ:

Місцезнаходження:

Форма власності:

Сфера управління:

Ідентифікатор ROR: Не застосовується

VIII. Заключні відомості

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові
голови ради**

Єльська Ганна Валентивна

**Власне Прізвище Ім'я По-батькові
головуючого на засіданні**

Кунах Віктор Анатолійович

**Відповідальний за підготовку
облікових документів**

Реєстратор

**Керівник відділу УкрІНТЕІ, що є
відповідальним за реєстрацію наукової
діяльності**



Юрченко Т.А.