

ОТЗЫВ
на диссертационную работу Фирсова Алексея Петровича
«Получение рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического
назначения в растительных экспрессионных системах»,
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности
1.5.6. Биотехнология

Актуальность темы исследования.

Диссертационная работа А.П. Фирсова посвящена одной из важнейших и динамично развивающихся областей современной биотехнологии — получению рекомбинантных белков в растительных экспрессионных системах (биофармингу). Актуальность темы не вызывает сомнений и обусловлена рядом факторов. Во-первых, существует постоянная потребность в значительных количествах рекомбинантных белков для медицины, ветеринарии и промышленности. Традиционные системы (бактериальные, дрожжевые, культуры клеток млекопитающих) имеют свои ограничения: бактериальные системы не способны к сложным посттрансляционным модификациям, а системы на основе клеток млекопитающих характеризуются высокой стоимостью производства и необходимостью особого контроля с точки зрения биобезопасности..

Растительные системы предлагают привлекательную альтернативу, сочетая способность к эукариотическим посттрансляционным модификациям с низкой себестоимостью и возможностью масштабирования. Однако, как справедливо отмечает автор, остаются нерешенными вопросы повышения уровня накопления целевых белков, их оптимальной компартиментализации и разработки эффективных методов очистки. Особую актуальность работе придает необходимость создания замкнутых культивационных систем, исключающих неконтролируемый вынос рекомбинантной ДНК в окружающую среду, что соответствует современным экологическим и регуляторным требованиям. Таким образом, исследование, направленное на разработку и изучение растительных экспрессионных систем для получения белков различного назначения, является своевременным и практически значимым.

Научная новизна.

Диссертационная работа А.П. Фирсова содержит ряд существенных новых научных результатов, полученных впервые:

1. Впервые показана высокая стабильность и полное сохранение органолептических характеристик рекомбинантного тауматина II в растительных тканях. Рекомбинантный тауматин II был впервые выделен из плодов томата, а его идентичность натуральному белку

подтверждена методом MALDI-MS. Разработанный протокол обеспечил высокий выход и чистоту целевого продукта. Показано, что максимальное накопление тауматина II достигается при его экспрессии в препроформе с нативными N- и C-концевыми сигнальными пептидами, а накопление в плодах томата в 20-100 раз выше, чем в листьях.

2. Установлено, что пептид M2e вируса гриппа птиц без слияния с белком-партнером не экспрессируется в растениях, в то время как его слияние с β -глюкуронидазой или субъединицей В рицина (RTB) ведет к стабильному накоплению. Впервые получены стабильно трансформированные растения ряски малой, экспрессирующие пептид M2e, слитый с RTB. Показано, что оральная иммунизация мышей препаратами из этих растений вызывает индукцию специфических к этому пептиду антител.
3. Впервые получены трансгенные растения ряски малой, трансформированные геном гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека (ГКСФ) человека с оптимизированной для экспрессии в растениях структурой. Достигнут уровень накопления рекомбинантного ГКСФ до 70 мг/кг сырой массы, что превышает показатели большинства экспериментов со стабильно трансформированными растениями.
4. Показана важность оптимальной компартментализации рекомбинантных белков для их максимального накопления.

Теоретическая и практическая значимость работы.

Теоретическая значимость работы заключается в углублении понимания процессов экспрессии, накопления и компартментализации гетерологичных белков в растениях. Полученные данные о влиянии сигнальных пептидов и внутриклеточной локализации на стабильность и уровень накопления целевых продуктов вносят важный вклад в теорию биофарминга.

Практическая значимость исследования подтверждается созданием конкретных растительных линий-продуцентов. Полученные линии томата, накапливающие тауматин II, могут быть использованы для получения этого сверхсладкого белка для пищевой и фармацевтической промышленности. Разработанный лабораторный протокол выделения тауматина II обеспечивает его высокий выход и чистоту. Линии ряски малой, продуцирующие ГКСФ человека, являются перспективной платформой для получения этого важного терапевтического белка. Кроме того, результаты работы демонстрируют возможность создания съедобных вакцин на основе ряски, что подтверждено экспериментами по индукции специфических антител у мышей. Полученные данные будут востребованы при разработке замкнутых культивационных систем, минимизирующих экологические риски.

Структура и объем диссертации.

Диссертационная работа изложена на 363 страницах, состоит из введения, обзора литературы, главы «Материалы и методы», главы «Результаты и обсуждение», заключения, выводов, списка сокращений и списка цитируемой литературы, включающего 480 наименований. Работа содержит 86 рисунков и 43 таблицы. Структура работы логична и отражает последовательное решение поставленных задач.

Содержание работы.

В первой главе представлен подробный обзор литературы, в котором проанализированы современные экспрессионные системы, их достоинства и недостатки, обоснованы преимущества растительных платформ. Детально рассмотрены такие перспективные объекты, как ряска малая и томат, а также целевые белки: тауматин II, пептид M2e, гирудин и ГКСФ. Глава написана понятным языком, удачно дополнена большим количеством сравнительных таблиц, хорошо систематизирующих обширный материал. Материалы обзора литературы могут стать основой хорошего учебного пособия или главой учебника по биотехнологии растений.

Во второй главе «Материалы и методы» описаны использованные методы молекулярного клонирования, генетической трансформации растений (табака, томата, ряски), а также методы анализа экспрессии (ПЦР, ОТ-ПЦР, Вестерн-блот, ИФА), выделения и очистки белков, оценки их иммуногенности.

В третьей главе «Результаты и обсуждение» представлены основные экспериментальные данные. Автором проведена масштабная работа по созданию и анализу трансгенных растений томата, экспрессирующих тауматин II, с детальным изучением влияния компартиментализации на его накопление, органолептические свойства плодов и агрономические характеристики. Разработан метод очистки тауматина II. Также получены трансгенные растения табака и ряски, экспрессирующие пептид M2e в слиянии с различными партнерами, и проведена оценка иммуногенности полученных препаратов на мышах. Проведена работа по созданию трансгенных растений ряски, продуцирующих гирудин и ГКСФ человека, с оптимизацией структуры генов для повышения уровня экспрессии.

В заключении обобщены полученные результаты, сформулированы выводы, которые полностью соответствуют поставленным задачам и отражают основные результаты работы.

Замечания по работе.

1. Обзор литературы выиграл бы от наличия логических связей между разделами. В текущей версии переходы между общеметодическими вопросами, описанием конкретных растений и белков выглядят довольно внезапными.
2. В работе использовано название бактерии *Rhizobium rhizogenes*, в то время как на момент публикации текста диссертации в открытом доступе данный организм получил новое наименование *Martinezella rhizogenes* (Riker et al. 1930) Naranjo-Robayo et al. 2026
3. В разделе 2.1 «Молекулярное клонирование ДНК» диссертации указано: «Выделение плазмидной ДНК из клеток *E.coli* и *A. tumefaciens* проводили...». Использование одного и того же протокола для выделения плазмид из двух разных организмов вызывает вопросы ввиду различий плазмид по размеру и копийности, а также самих бактерий по строению клеточных стенок и т.д.
4. На рисунке 23 автор представил результаты Саузерн блот анализа геномной ДНК независимо полученных трансгенных линий томата, трансформированных геном тауматина II. Результаты автор интерпретировал с точки зрения присутствия в геномах большинства линий двух копий целевого гена. Однако, данные, представленные таким образом, не убеждают читателя в правомерности такого вывода. Не понятно – почему несколько независимых линий имеет схожий паттерн гибридизационных сигналов, представленных четко различимыми высокомолекулярными фрагментами. Без рестрикционной карты Т-ДНК и информации о размере и области гибридизации зонда эти данные интерпретировать невозможно. В настоящее время общепризнанным для тонкой оценки копийности является метод цифровой ПЦР.
5. Как можно объяснить расхождения ИФА и органолептической оценки линий томатов с геном тауматина II? Оценивали ли у растений биохимический состав, в частности, содержание сахаров?
6. Автор утверждает, что RTB обладает адъювантным эффектом (стр. 279), но не сравнивает его с известными адъювантами. Без такого сравнения нельзя сказать, насколько RTB эффективен.
7. Чем можно объяснить низкий уровень экспрессии гирудина в рыске?

8. Для наиболее перспективных линий важно определить сайт интеграции Т-ДНК в геном и сделать диагностику для узнавания конкретных линий. Эта работа сделала бы исследование более целостным, а полученные линии приблизила бы к практическому внедрению.

Высказанные замечания и вопросы носят дискуссионный характер и не влияют на высокую оценку работы.

Заключение.

Диссертационная работа Фирсова Алексея Петровича «Получение рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического назначения в растительных экспрессионных системах» является законченной научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований решена крупная научная проблема, имеющая важное хозяйственное значение — разработка и изучение растительных экспрессионных систем для получения рекомбинантных белков. По своей актуальности, научной новизне, теоретической и практической значимости работа полностью соответствует всем требованиям пп. 9-14 «Положения о присуждении научных степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации № 842 от 24 сентября 2013 г. (в редакции с изменениями, утвержденными Постановлением Правительства РФ от 21 апреля 2016 г. №335), предъявляемым к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, А.П. Фирсов, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.6. Биотехнология.

Профессор кафедры генетики и биотехнологии
Федерального государственного бюджетного
Образовательного учреждения высшего
образования «Санкт-Петербургский
государственный университет»,

доктор биологических наук по специальности
03.02.07 - генетика

Контактные данные:

199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9, Федеральное государственное бюджетное
Образовательное учреждение высшего образования «Санкт-Петербургский государственный
университет», тел. + 7 (812) 36 36 105 e-mail: t.v.matveeva@spbu.ru,
[https://pureportal.spbu.ru/ru/persons/--\(1a732895-31bc-46c1-81d9-f6652a9dbab5\).html](https://pureportal.spbu.ru/ru/persons/--(1a732895-31bc-46c1-81d9-f6652a9dbab5).html)

ПОДПИСЬ РУКИ

Матвеева Т.В.
УДОСТОВЕРЯЮ

ЗАМЕСТИТЕЛЬ НАЧАЛЬНИКА
УПРАВЛЕНИЯ КАДРОВ
М.С. ЗУБОВА

21.09.2016



Матвеева Татьяна Валерьевна