

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН),

Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук
– обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН (ИФПБ РАН)

142290, г. Пушкино Московской обл., ул. Институтская, д.2

Тел. (4967)73-37-18, факс (4967)33-05-32, e-mail: ifpb@issp.serpukhov.su

ОТЗЫВ

официального оппонента 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.

В диссертационной работе Фирсова Алексея Петровича описано успешное исследование по получению растений – продуцентов рекомбинантных белков различного функционального назначения. В качестве систем для наработки рекомбинантных белков использованы несколько биологических платформ, включая растения табака, томата и ряски, при необходимости использовали и бактериальную систему. Спектр исследуемых целевых белков включал в себя соединения терапевтического и промышленного назначения: сладкий белок тауматин, который используется как безопасный модификатор и усилитель вкуса в промышленности, пептид M2e вируса гриппа птиц, который может быть использован для создания противогриппозных вакцин, гирудин, обладающий мощным антикоагулянтным действием, и гранулоцитарный колониестимулирующий фактор человека, представитель семейства цитокинов, использующийся в медицине для лечения онкологических заболеваний, тяжелых хронических и врожденных нейтропений, а также в трансплантологии. Каждое направление работы – завершённое исследование, при этом все направления гармонично объединяются и дополняют друг друга, расширяя наши представления о потенциале растительных экспрессионных систем для

биофарминга и развивая современные методы получения рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического назначения.

Высокая научная ценность и актуальность данного исследования определяется острой потребностью общества в современных методах получения рекомбинантных белков в медицине, промышленности и сельском хозяйстве при одновременной недостаточности знаний о биотехнологическом потенциале разных растений в качестве продуцентов рекомбинантных белков. Все поставленные и решаемые задачи имеют очевидную практическую направленность. Полученные результаты, несомненно, будут использованы в последующих исследованиях по разработке экспрессионных систем на основе использованных в работе растений.

Научная новизна и оригинальность представленной работы являются неоспоримыми. Исследования, проводимые автором представленной диссертации, соответствуют передовому мировому уровню, описанные трансгенные растительные линии с заданными свойствами получены впервые. Достоверность результатов диссертационного исследования подтверждается корректным применением методов статистического анализа, а также верифицируется объективными данными визуализации, включая электрофореграммы и блот-анализы.

Цели и задачи диссертационной работы ясно сформулированы. Во введении и литературном обзоре хорошо обоснованы целесообразность проведенных исследований, выбор объектов трансформации, а также практическое значение целевых белков. Все задачи диссертационной работы решены, так как в ходе исследований удалось добиться накопления рекомбинантных белков различного функционального назначения в растительных тканях. Все выводы диссертации обоснованы, подтверждены экспериментальными данными, опубликованы в рецензируемых журналах и представлены на научных конференциях.

Общая характеристика работы

Диссертационная работа представляет собой объемный труд, изложена на 363 страницах, включает 86 рисунков и 43 таблицы. Большой список цитируемой литературы, представленный 480 источниками, говорит о большой аналитической работе, проведенной автором диссертации.

Литературный обзор написан очень интересно, понятным научным языком. В обзоре подробно разобраны как достоинства, так и недостатки разных экспрессионных систем. Очень убедительно написано о перспективности использования растений в качестве продуцентов ценных соединений. Обзор хорошо подготавливает читателя для восприятия экспериментальных разделов диссертации. Считаю, что материал литературного обзора, представляющий современное состояние направления биотехнологии, связанное с продуцированием белков в растениях, стоит опубликовать как самостоятельный труд и рекомендовать использовать в образовательных целях.

Для решения сложных экспериментальных задач в работе применялись разнообразные молекулярно-биологические и биохимические методы. Основа диссертации – это создание трансгенных растений, поэтому основная часть экспериментальной работы связана с оптимизацией методов трансформации растений, скрининга трансгенных линий и подбор условий для экспрессии чужеродных белков. Выполнение работы также было бы невозможным без привлечения методов биоинформатики, микробиологии, и дополнительных функциональных анализов, как, например, органолептический анализ в случае изучения возможности продуцирования тауматина. Для разделения и очистки рекомбинатных белков были использованы несколько хроматографических подходов, включая аффинную хроматографию, эксклюзионную хроматографию на колонке с носителем SepFast GF-HS-M, разделение белков на носителях SP-сефарозе и DEAE-сефарозе. Для оценки функциональной целостности экспрессируемого белка использовали биохимические особенности его компонентов, например, асиалофетуин-связывающую активность субъединицы В рицина в составе слитного рекомбинантного белка, включающего последовательность полипептида M2e вируса гриппа птиц. Для оценки числа

вставок перенесенных генов в геном растения-хозяина использовали метод Саузерн блот. Все методы и экспериментальные процедуры описаны подробно.

Главу «Результаты и Обсуждение» можно разделить на несколько секций, посвященных тому или иному целевому белку. Работу с каждым белком характеризуют свои особенности и трудности, раскрывающиеся в подробном описании конструирования векторов для трансформации, процедуры трансформации, получения эксплантов и селекции трансгенных растений. Для наработки целевых белков проводилась оптимизация нуклеотидных последовательностей гена, оптимизировались регуляторные участки перенесенных генов, последовательности N- и С-концевых пептидов, а также добавлялись последовательности, направляющие целевой белок в разные клеточные компартменты, включая апопласт. Также вносились последовательности для визуализации белков в тканях растений и очистки рекомбинантных белков. Анализы экспрессии перенесенного гена и накопления целевого белка с помощью вестерн-блот анализа проводились иногда в течение нескольких лет для наблюдения за стабильностью наследования и экспрессии перенесенного гена. При экспрессии всех упомянутых генов, тауматина, пептида M2e вируса гриппа птиц, гирудина, и гранулоцитарного колониестимулирующего фактора человека, автор диссертации касается вопроса влияния перенесенного гена на физиологические характеристики трансгенного растения, при необходимости описывая специфические эффекты и приводя соответствующие фотографии (как в случае с продуцированием тауматина в томатах). Заслуживает внимания и работа по иммунизации животных рекомбинантными белками, содержащими пептид M2e, когда эффективность иммунизации значительно повышалась при иммунизации мышей белком, слитым с субъединицей В рицина.

В целом работа демонстрирует перспективность использования растений для получения рекомбинантных белков, что свидетельствует о высокой практической значимости представленной работы. Особенно убедительно

показано, что зрелые плоды томата являются удобной платформой для биофарминга.

При том, что материал изложен в строгом научном стиле, диссертацию интересно читать. Отчасти потому, что обширный материал хорошо осмыслен и систематизирован. Детализация изложенного материала обеспечивает более глубокое раскрытие темы, расширяет содержательную часть исследования и повышает его теоретическую значимость. Примером может служить решение проблемы затухания экспрессии гена белка M143- β -глюкуронидаза после 6 месяцев роста трансгенных линий в теплице путем клонирования вариантов, кодирующих пептиды с частично или полностью удаленным трансмембранным доменом. Особую привлекательность работе придают сравнения с данными других исследовательских групп.

Автореферат отражает содержание диссертации.

При ознакомлении с работой возникли следующие вопросы:

- На Рисунке 31 (Б и В) обнаруживается небольшая разница в подвижности форм тауматина в линиях lt4, lt21, lt15 и lt19. Такие различия следовало бы обсудить в тексте диссертации.

- Для улучшения восприятия материала рекомендуется указывать используемые антитела непосредственно в подписях к рисункам с результатами вестерн-блоттинга. Несмотря на то, что перечень используемых антител приведен в главе «Материалы и методы», их дублирование под рисунками существенно упростило бы чтение работы.

В тексте объемной диссертации встречаются ошибки технического характера.

Некоторые сокращения следовало расшифровать при первом упоминании, даже если они перечислены в списке сокращений (например, RTB, а.о.).

T. daniellii - при первом упоминании организма следовало написать название вида полностью, включая родовое название.

Написано: «Хлоропласты возникли около 1,5 млрд. лет назад, в результате развития эндосимбиотических отношений между древними примитивными

растениями и фотосинтезирующими цианобактериями». Правильнее было бы написать о симбиозе между цианобактериями и одноклеточными гетеротрофами.

Фразу «пост-транскрипционное замолкание» лучше заменить на «пост-транскрипционное замалчивание»

Названия видов (*Carthamus tinctorius* L., *Wolffia arrhiza* L.) – всегда должны быть написаны курсивом.

В работе приведено определение цисгенных растений: «...цисгенные растения, т.е. растения, трансформированные только целевым геном, без генов устойчивости к селективным антибиотикам». Для того чтобы растение считалось цисгенным, переносимый целевой ген должен быть взят строго от того же вида растения или от близкородственного вида, с которым возможно традиционное скрещивание.

Все указанные недочеты стилистического характера несколько не снижают ценности рассматриваемой диссертационной работы. Диссертационная работа Фирсова А.П. представляет собой оригинальное исследование, соответствующее современному уровню науки, результаты исследований представляют значительный практический интерес. Основные научные результаты, включенные в диссертационную работу, опубликованы в журналах из списка ВАК.

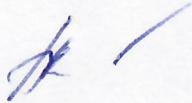
Полнота изложения материалов диссертации в опубликованных работах. По теме диссертационной работы автором опубликовано 17 научных статей (всего у соискателя является соавтором 31 научной статьи) в рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК, и главы в монографиях. Все результаты диссертационной работы изложены в опубликованных статьях.

Заключение

Работа Фирсова А.П., посвященная изучению возможности получения рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического назначения в растительных экспрессионных системах, имеет высокую научную и

практическую значимость. Объем, качество и актуальность выполненных исследований полностью соответствуют требованиям, установленным разделом II «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 года № 842 (с изменениями, внесенными Постановлением Правительства РФ № 1539 от 11.09.2021 г.), предъявляемым к докторским диссертациям, а также паспорту специальности «1.5.6 – биотехнология». На основании вышесказанного Фирсов Алексей Петрович, несомненно, заслуживает присуждения степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6 – биотехнология.

Главный научный сотрудник лаборатории
фотосинтетического окисления воды Института
фундаментальных проблем биологии РАН,
доктор биологических наук
(специальность – 03.01.05. (1.5.21.) физиология и биохимия растений)
«14» сентября 2026 г.

 Татьяна Викторовна Савченко

Контактные данные

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки "Федеральный исследовательский центр "Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук"

Почтовый адрес: 142290, гор. Пущино, ул. Институтская, д. 2. Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт фундаментальных проблем биологии Российской академии наук.

Телефон: +7 (496)773-37-18.

Адрес электронной почты: savchenko_t@rambler.ru

