

ОТЗЫВ

на автореферат диссертационной работы

Фирсова Алексея Петровича

«Получение рекомбинантных белков промышленного и фармацевтического назначения в растительных экспрессионных системах», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология»

Диссертационная работа Фирсова Алексея Петровича посвящена проблеме создания и оптимизации растительных экспрессионных систем для синтеза рекомбинантных белков различного назначения. Экспрессия рекомбинантных белков в растениях хотя и имеет ряд преимуществ до настоящего времени не получила широкого применения по сравнению с экспрессией белков в бактериальных, дрожжевых системах и в культурах клеток млекопитающих и насекомых. Вместе с тем потенциал растений для синтеза пептидов и белков для нужд фармацевтической и пищевой промышленности значителен, но по ряду причин не используется в полной мере. Совершенствование растительных экспрессионных систем остается востребованным направлением биотехнологии, в связи с чем диссертационная работа Фирсова Алексея Петровича несомненно является актуальным исследованием. В работе для повышения уровня накопления целевых белков решались такие задачи как выбор видов растений-продуцентов, совершенствование структуры экспрессионных кассет, оптимизация транспорта целевого белка в компартменты клетки или органы растения, подходящие для его накопления и последующего выделения. Актуальным направлением также является разработка замкнутых систем для культивирования растений - продуцентов, исключаящих неконтролируемый вынос в окружающую среду рекомбинантной ДНК.

Автором получен целый ряд новых, важных результатов. Получена линия трансгенных томатов, накапливающая в плодах тауматин на уровне до 150 мг/кг сырой массы плодов, разработан протокол выделения очищенного рекомбинантного тауматина II. Продемонстрировано, что максимальное накопление рекомбинантного тауматина II в трансгенных растениях наблюдалось при его экспрессии в препроформе с нативными N- и C-концевыми сигнальными пептидами, причем накопление тауматина II в плодах томата было в 20-100 раз выше, чем в листьях. Полученная линия может быть использована как продуцент этого белка для нужд пищевой и фармацевтической отраслей промышленности.

В растениях табака и ряски экспрессирован пептид M2e вируса гриппа птиц H5N1. Показано, что его стабильная экспрессия в растениях наблюдается только при слиянии пептида M2e с β -глюкуронидазой или с субъединицей В рицина. Установлен оптимальный размер нуклеотидной последовательности, кодирующей пептид, для его эффективной экспрессии. Получены стабильно трансформированные растения ряски малой, экспрессирующие пептид M2e, слитый с субъединицей В рицина. Оральная иммунизация мышей препаратами белка

трансгенных растений ряски, содержащими этот рекомбинантный пептид, вызывала индукцию специфических к пептиду M2e антител.

Особый интерес представляют результаты исследований по использованию трансгенных растений ряски малой для получения рекомбинантных белков различного функционального назначения. Полученные в работе линии ряски, накапливающие до 70 мг/кг сырой массы рекомбинантного ГКСФ человека, могут быть использованы как продуценты этого белка с использованием замкнутых культивационных систем, минимизирующих экологические риски.

К результатам, представленным в автореферате, имеется ряд вопросов и замечаний:

В первой части работы при получении трансгенных табаков и томатов, экспрессирующих сверхсладкий белок тауматин II, приведены детальные данные органолептического анализа листьев и плодов. С какой целью? На мой взгляд при получении растения-продуцента достаточно молекулярно-биологических доказательств синтеза и анализа целевого белка. Вкусовая идентичность белка характеризуется в выделенном образце, что и было показано автором.

Рис. 9 и 12 показаны схемы конструкций и соответствующие последовательности нуклеотидов, оптимизированные для ряски, тогда как описывается трансформация растений табака.

На рисунках, представляющих Вестерн-блоты (например, рис 13, 16, 21), не проставлены маркеры мол. масс белков, что затрудняет оценку результатов. Почему димеризация белка называется агрегированием (рис. 16)?

Таблица 7. Для дальнейшего анализа выбраны трансгенные линии 51 и 54 как синтезирующие наибольшие количества рекомбинантного белка. Тогда как линии 16, 50 и 96 синтезируют не меньше. Чем обусловлен такой выбор?

В заключении следует отметить, что в автореферате дается полное представление о проведенном исследовании и полученных результатах. Автореферат иллюстрирован 26 рисунками и 8 таблицами. Выводы соответствуют полученным результатам. Высказанные замечания не влияют на общую высокую оценку проведенного исследования.

Таким образом, соискателем проведена значительная по объему экспериментальная работа, оптимизированы генно-инженерные конструкции для экспрессии ряда рекомбинантных белков, получены линии трансгенных растений, которые могут быть использованы для продукции рекомбинантных белков для нужд пищевой и фармацевтической отраслей промышленности.

Диссертационная работа Фирсова Алексея Петровича «Получение рекомбинантных белков индустриального и фармацевтического назначения в растительных экспрессионных системах» по актуальности темы, объему и уровню проведенных научных исследований,

новизне и научно-практической значимости полученных результатов является законченной научно-квалификационной работой, которая полностью соответствует требованиям пп. 9-14 Положения «О порядке присуждения ученых степеней», утвержденного Постановлением Правительства Российской Федерации №842 от 24.09.2013 г. (в ред. Постановлений Правительства РФ (от 30.07.2014 N 723, от 21.04.2016 N 335, от 02.08.2016 N 748, от 29.05.2017 N 650, от 28.08.2017 N 1024, от 01.10.2018 N 1168, от 20.03.2021 N 426, от 11.09.2021 N 1539, от 26.09.2022 N 1690, от 26.01.2023 N 101, от 18.03.2023 N 415, от 26.10.2023 N 1786, от 25.01.2024 N 62, от 16.10.2024 №1382, от 18.07.2026 №905 ред. от 18.07.2026 г.), предъявляемым к кандидатским и докторским диссертациям, а ее автор несомненно заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Доктор биологических наук, профессор,
ведущий научный сотрудник
отдела биохимии вирусов растений
НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского
ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Калинина

Калинина Наталья Олеговна

ПОДПИСЬ
УДОСТОВЕРЯЮ
ЗАВ.КАНЦЕЛЯРИИ
Н.Н. СИДОРОВА

