

**Отзыв официального оппонента Антоновой Ольги Юрьевны
на диссертацию Бурлаковского Михаила Сергеевича
на тему «Анализ трансгенных растений, продуцирующих гамма-интерферон
животных для применения в ветеринарии»,**

**представленную на соискание степени
кандидата биологических наук по специальности
03.02.07. – Генетика.**

Актуальность избранной темы

Представленная работа посвящена крайне актуальной теме – созданию съедобных для животных трансгенных растений – продуцентов белков интерферонов и, в частности, гамма-интерферона. Интерфероны являются мощными стимуляторами иммунной системы животных, в отличие от антибиотиков они не способствуют появлению устойчивых форм микроорганизмов, не вызывают привыкания и не представляют угрозы для человека при попадании в продукты животноводства. Очень привлекательной выглядит возможность введения их животным перорально, вместе с кормовыми растениями. Создание растений, продуцирующих интерфероны в ходе вегетации, стало возможно с развитием методов генетической инженерии, в настоящее время над этой проблемой работают десятки научных лабораторий и фармацевтических компаний во всем мире. Данная работа направлена на получение трансгенных растений – иммуномодуляторов для животноводства, она вносит свой вклад в создание конструкций для трансформации растений, съедобных для животных, а также в изучение проблемы интеграции генетических конструкций в ядерные геномы растений

Научная новизна

В исследовании Бурлаковского М.С. впервые выявлены различия по уровню накопления целевого белка – гамма интерферона – между линиями табака, исходно трансформированными одной конструкцией, и показано, что на этот показатель влияет, прежде всего, интеграция трансгена у двух линий в районы с разной транскрипционной активностью. Впервые созданы трансгенные конструкции для синтеза бычьего гамма-интерферона под контролем тканеспецифичных промоторов батата pIbSRD1 и кукурузы pZmRCP-1, а также конструкции для визуализации области экспрессии данных промоторов. С использованием этих конструкций получены «бородатые корни» моркови и показана экспрессия целевого гена под контролем промотора pIbSRD1 во всех тканях корня. В растениях батата впервые установлено присутствие двух разных форм промотора pIbSRD1, одна из которых содержит делецию 40 п.о. и обладает значительно меньшей активностью.

Значимость работы

Целью данной работы был с одной стороны, анализ уже имеющихся трансгенных линий табака, несущих ген бычьего гамма-интерферона под контролем 35S промотора, и с другой стороны, создание новых генно-инженерных конструкций для последующего получения более эффективных растений – продуцентов, съедобных для животных. Было показано стабильное наследование и экспрессия рекомбинантного гена у потомков от самоопыления исходных линий на протяжении пяти поколений, но при этом разный уровень накопления гамма-интерферона у потомков разных линий. Установлены сайты локализации трансгенной вставки у исходных линий, показано, что у линии с меньшей активностью накопления белка интерграция произошла в области в области теломерных повторов. Тем самым продемонстрирована важность определения места интеграции трансгенной вставки на ранних этапах получения растений-продуцентов. Созданы генетические конструкции, в которых ген гамма-интерферона находится под контролем промоторов батата pIbSRD1 и кукурузы pZmRCP-1, показана работа промотора батата во всех тканях трансформированных корней моркови. Тем самым продемонстрирована принципиальная возможность получения растений- продуцентов рекомбинантного гамма – интерферона быка. Разработанные в работе праймеры позволяют дифференцировать активную и неактивную копии промотора, присутствующие у батата, и тем самым проводить отбор активных копий еще на стадии создания конструкций.

Основное содержание

Представленная диссертация изложена на 154 страницах и имеет традиционные разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы и список литературы. Список литературы включает 211 источников, из них 175 на английском языке. Значительная часть источников представляет собой новейшие исследования за последние пять лет. Работа содержит 27 рисунков и 23 таблицы.

Раздел «Обзор литературы» представлен на 45 страницах. В нем очень подробно рассматриваются вопросы, связанные с темой данной работы: получение и анализ трансгенных растений, производящих гамма-интерферон животных. Соответственно, в обзоре подробно анализируются методы получения трансгенных растений, механизмы встраивания Т-ДНК в геном, сопоставляются возможности трансформации ядерного, пластидных и митохондриальных геномов. Другая часть обзора посвящена целевому объекту клонирования – белкам цитокинам, их классификации, созданным на их основе

коммерческим препаратам для лечения различных заболеваний. Большое внимание уделяется рекомбинантным цитокинам, способам их получения в различных супензионных культурах клеток растений и в тканях взрослых растений. Особый интерес представляет таблица, обобщающая сведения о рекомбинантных цитокинах, полученных в разных растениях с использованием различных методов трансформации. Обзор написан очень хорошим и понятным языком, логически структурирован и дает представление о самых последних достижениях в рассматриваемой области.

Единственное, на мой взгляд, упущение автора – в разделе, посвященном трансформации митохондрий, отсутствуют ссылки на статьи российских исследователей из СИФИБР СО РАН, которые достаточно успешно работают в этой экспериментальной области еще с начала 2000-х годов (Koulinchenko et al., 2003; Mileshina et al., 2011).

Раздел «Материалы и методы» занимает 29 страниц, что уже свидетельствует о крайне разнообразной и сложной методологии работы. Объектом исследований служат трансгенные растения табака *Nicotiana tabacum*, для решения отдельных задач привлекаются также морковь посевная *Daucus carota*, батат *Ipomoea batatas* и кукуруза *Zea mays*. Также применяются различные штаммы *Escherichia coli*, *Agrobacterium rhizogenes*, а для изучения биологической активности рекомбинантного белка – культуры клеток быка и лабораторные мыши. Поражает разнообразие методов, необходимых для выполнения поставленных в работе задач: наряду с методами биотехнологии, генетической инженерии растений и ДНК-анализа автор использует методы работы с белками (выделение и очистку целевого белка из растений табака, вестерн-блот анализ), цитологические методы (микроскопический анализ мазков крови), методы работы с культурой клеток млекопитающих и даже с лабораторными животными. Все методы описаны подробно, стратегия разработки праймеров для «прогулки по геному» проиллюстрирована красочной схемой.

Вызывают вопросы только два момента: способ отбора клонов со вставкой чужеродной ДНК при трансформации *E. coli* и концентрация матрицы при проведении второго и третьего этапов FPNI-PCR (проводилось ли разведение полученного на предыдущем этапе ПЦР-продукта и если да, то во сколько раз).

В разделе «Результаты» подробно изложены полученные результаты по всем направлениям исследования. Основным объектом исследования были растения табака – потомки от самоопыления двух трансгенных линий InterB и Inter311, несущих ген sIFNG (кодирует гамма-интерферон) под контролем 35S промотора. На первом этапе методами ПЦР и ОТ_ПЦР было доказано присутствие трансгенной вставки у растений поколений T4 и T5, причем как на уровне ДНК, так и на уровне иРНК. Также все образцы

продемонстрировали присутствие в тканях белка гамма-интерферона при вестерн-блот анализе. Однако при определении биологической активности белков результаты у двух линий оказались различны. Интерферон, синтезируемый растениями-потомками линии Inter311, обладал высокой противовирусной активностью, в то время как активность экстракта у потомков линии InterB оказалась гораздо ниже. Была также показана потеря активности экстракта из растений, подвергнутых долговременному хранению при -80°C.

Следует отметить, что таблица 22, в которой представлены результаты анализа биологической активности препаратов интерферона из трансгенных растений, **вызывает несколько вопросов**. Прежде всего, в ней представлены данные для четырех разных дат (05.06.13, 13.03.14, 21.04.16 и 20.05.16), причем с течением времени активность препаратов у потомков линии Inter311 снижается, а у потомков линии InterB исчезает. Однако ни в разделе «Методы», ни в тексте раздела «Результаты» не объясняется, почему исследование проводили в 4 повторностях и не обсуждается падение активности препаратов. Кроме того, в тексте никак не отмечено присутствие некоторой активности (40 МЕ/мл) в экстракте нетрансгенных растений табака при измерении 05.06.13.

Гамма-интерферон, синтезированный в растениях линии Inter311.2.7, обладал также биологической активностью при испытании на лабораторных животных при пероральном применении. Таким образом, две линии табака, полученные на основе применения одной трансгенной конструкции, и их потомки от самоопыления отличались по уровню синтеза рекомбинантного белка. Автором были проверены две основные гипотезы, объясняющие причины этого явления. Первая гипотеза связывала изменение активности с мутацией в целевом гене. Для ее проверки было разработано большое количество специфичных праймеров, перекрывающих трансгенную вставку фрагментами примерно по 1000 п.о., Секвенирование полученных фрагментов показало, что вставки в линиях Inter311.2.7.2-2 и InterB6.13.8-17 идентичны друг другу и последовательности в исходной конструкции. Вторая гипотеза основывалась на предположении об интеграции трансгена у двух линий в районы с разной транскрипционной активностью. Для ее подтверждения была проведена локализация сайтов трансгенных вставок в геноме табака методом «прогулки по геному». В результате огромной работы по разработке праймеров и секвенирования большого числа ПЦР-фрагментов удалось получить последовательности участков геномной ДНК табака, окружающих районы трансгенных вставок. Было показано, что вставка у линии с низким уровнем наработки рекомбинантного белка произошла в области теломерных повторов, а у более активной линии – в транскрипционно активный участок генома. Автор делает обоснованный вывод о

необходимости проводить локализацию сайта связывания вставки на ранних этапах селекции.

При испытаниях активности рекомбинантного белка автор выявил изменение совокупного содержания эозинофилов и базофилов в группах лабораторных животных, получавших белковые экстракты как трансгенных, так и контрольных растений, и высказал предположение, что это может быть связано с аллергическими реакциями на белки самого табака. Поэтому дальнейшие усилия были направлены на разработку системы для трансформации моркови *D. carota*, которая в настоящее время является наиболее популярным видом растений для производства фармацевтических препаратов. Были созданы векторы для синтеза бычьего гамма-интерферона под контролем промоторов гена батата SRD1 (pIbSRD1) и гена кукурузы ZmRCP-1 (pZmRCP-1), и на их основе – штаммы *A. rhizogenes*, позволяющие успешно трансформировать растения моркови. Проверка уровня целевого белка у трансформированных растений методом GUS-окрашивания показала, что промотор кукурузы pZmRCP-1 обеспечивает экспрессию только в кончиках корней, а промотор батата pIbSRD1 – во всех тканях корня. Поэтому именно этот промотор был признан перспективным для получения растений-продуцентов. При этом автор выявил гетерозиготность растений батата по формам данного промотора – одна из копий была активна и успешно обеспечивала экспрессию рекомбинантного белка, а другая содержала делецию 40 п.о. и обладала значительно меньшей активностью. Разработанные в данной работе праймеры позволяют различать активную и неактивную копии методом ПЦР-анализа и, следовательно, отсекать неактивные копии на ранних этапах создания трансгенных растений, что является предпосылкой будущих успешных экспериментов в этой области.

Таким образом, поставленные цели и задачи в ходе выполнения данного исследования были выполнены. Выводы полностью соответствуют полученным в работе результатам.

Текст написан хорошим грамотным языком и почти свободен от опечаток. **Некоторые вопросы** вызывает цитирование рисунков и таблиц в тексте. Например, рисунок 18 состоит из трех частей (A, B и C), но в тексте все они цитируются только как рисунок 18. В тексте отсутствует ссылка на Таблицу 1. Начало Таблицы 3 расположено в самом низу страницы 42, таким образом, что на этой странице помещается только первая строка. В ряде случаев рисунки расположены до их первого упоминания в тексте.

Однако мелкие недостатки никак не могут умалить достоинств данной работы.

Заключение

Работа Бурлаковского М.С. выполнена на высоком научно-методическом уровне и соответствует мировым стандартам в области исследований по генетической инженерии растений. Полученная автором информация о зависимости уровня экспрессии гена гамма-интерферона от транскрипционной активности района интеграции трансгенной вставки и о перестройках вставок в процессе интеграции в геном растения важна как в теоретическом, так и в практическом плане. Важным практическим результатом является создание конструкций для трансформации съедобных растений, не вызывающих у животных аллергической реакции, наличие которой для табака также было убедительно показано автором. Обоснованность научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации, не вызывает сомнений. Результаты исследования были представлены в виде научных статей в рецензируемых научных изданиях и многократно доложены на всероссийских и международных конференциях, кроме того, часть результатов была запатентована – патент РФ RU25641152014. Содержание автореферата полностью отражает содержание диссертационной работы.

Диссертационная работа Бурлаковского Михаила Сергеевича на тему «Анализ трансгенных растений, продуцирующих гамма-интерферон животных для применения в ветеринарии» соответствует критериям пп. 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24 сентября 2013 г. № 842 (ред. от 01.10.2018) и представляет собой завершенную научно-квалификационную работу, а ее автор, Бурлаковский М.С., несомненно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07. – Генетика.

Заведующий лабораторией
молекулярной селекции и
ДНК паспортизации ФБГНУ
«Федеральный исследовательский центр
Всероссийский институт генетических ресурсов
растений имени Н.И. Вавилова»
190000, Санкт-Петербург,
ул. Большая Морская, д. 42, 44
7 (812) 312-51-61, olgaant326@mail.ru
кандидат биологических наук

Ольга Юрьевна Антонова

Подпись Антоновой О.Ю.

УДОСТОВЕРЯЕТСЯ
Зав. канцелярией ВИР



25.05.20