

УТВЕРЖДАЮ:

Проректор – начальник
управления научной политики
и организации научных исследований
Декан биологического факультета

МГУ имени М.В.Ломоносова

А.А.Федягин

2020 г



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Бурлаковского Михаила Сергеевича

«АНАЛИЗ ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЙ, ПРОДУЦИРУЮЩИХ ГАММАИНТЕРФЕРОН ЖИВОТНЫХ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ В ВЕТЕРИНАРИИ»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 03.02.07 – Генетика

Актуальность диссертации

Работа Бурлаковского Михаила Сергеевича направлена на поиск наиболее эффективных генетических и генно-инженерных подходов для создания растений – продуцентов ценных фармацевтических белков. В трансгенных растениях уже получено множество белков животных и человека (ферменты, антигены, гормоны, антитела и др.). При продукции белков медицинского назначения, оказывающих эффект при пероральном употреблении, растения - продуценты позволяют полностью отказаться от процедур выделения, очистки и инъекционного введения, что позволяет рассматривать такие трансгенные растения как съедобные иммуномодуляторы и вакцины. В связи с тем, что растения-продуценты обладают рядом преимуществ в сравнении с иными организмами, их получением, исследованиям и использованием сегодня занимаются не менее 20 фармацевтические кампании по всему миру. Россия сильно отстает по масштабу исследований по данной научно-практической проблеме, которая еще не решена окончательно и требует дополнительных исследований. Именно такие исследования проведены в диссертационной работе Бурлаковского Михаила Сергеевича, что делает ее высоко актуальной как с точки зрения фундаментальных исследований, так и с практической точки зрения.

Научная новизна и практическая ценность работы

В работе показано стабильное наследование и экспрессия рекомбинантного гена в растениях табака на протяжении пяти поколений и отсутствие случаев его потери, что свидетельствует о получении гомозиготных линий (патент РФ RU2564115). Доказано, что растения-продуценты гамма-интерферона быка могут служить в качестве съедобных иммуномодуляторов. Объяснены различия в уровне накопления целевого белка между линиями табака InterB и Inter311, которые обусловлены встраиванием ТДНК в разные районы генома и кластерной структурой вставки у линии Inter311. Клонированы тканеспецифичные растительные промоторы pIbSRD1 батата и pZmRCP-1 кукурузы, созданы трансгенные конструкции как для визуализации их области экспрессии, так и для синтеза бычьего гаммаинтерферона под их контролем, продемонстрирована возможность использования промотора pIbSRD1 в генетических конструкциях для массовой продукции рекомбинантного белка в корнях. С использованием данных конструкций впервые получены «бородатые корни» моркови.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа Бурлаковского М.С. изложена на 154 страницах машинописного текста, содержит 23 таблицы, иллюстрирована 27 рисунками и состоит из введения, обзора литературы, описания материала и методов исследований, результатов, обсуждения, заключения, выводов, списка сокращений и списка использованной литературы, включающего 211 источников, в том числе 175 ссылок на зарубежных авторов. Диссертация построена по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов и обсуждения, заключения и выводов.

Во введении автор обосновывает актуальность и научную новизну проведенных исследований, дает краткую характеристику основных объектов исследования и направлений, по которым исследования проводились, формулирует цели и задачи. Обзор литературы (39 стр.) является компетентным введением в экспериментальную часть работы. В нем дается вся новейшая информация о современных возможностях генной инженерии и методах получения трансгенных растений, о сегодняшних представлениях о механизмах встраивания Т-ДНК в геном растения при агробактериальной трансформации. Важное место в обзоре удалено рассмотрению разнообразия цитокинов, их применению в медицине и ветеринарии, возможностях их получению с помощью растений, а также рассмотрению тех недостатков таких растений-продуцентов, которые ограничивают их

широкое использование. Обзор заканчивается кратким заключением, в котором диссертант суммирует те экспериментальные подходы, которые уже существуют и способствуют устраниению имеющихся ограничений в использовании растений-продуцентов, а также те направления исследований, которые должны способствовать разработке новых подходов.

В разделе «Материалы и методы» Бурлаковским М.С подробно описаны методы, использованные при выполнении работы. Это очень представительный набор современных методов, включая методы работы с ДНК, РНК, методы ПЦР и ПЦР-РВ, метод прогулки по геному FPNI-PCR (Fusion primers and nested integrated PCR, вложенной ПЦР со слитыми праймерами), методы клонирования трансгенных конструкций с использованием системы Gateway, методы выделения, очистки и оценки содержания рекомбинантного белка. Диссертант проводил также оценку биологической активности рекомбинантного белка с использованием культуры клеток трахеи плодов коров и вируса везикулярного стоматита, а также на лабораторных животных. Использованы также статистические методы и биоинформационные методы анализа.

Раздел «Результаты» состоит из двух основных разделов, каждый из которых содержит ряд подразделов. Первый раздел – посвящен исследованию трансгенных растений табака T4-T5 поколений, анализу наследования гетерологичного гена sIFNG, изучению экспрессии гена гамма-интерферона в трансгенных растениях поколения T5 и анализу содержания и активности гамма-интерферона из трансгенных растений с использованием культуры клеток быка и при пероральном применении на мышах. В ходе этих исследований диссидентом выявлены различия в продуктивности между линиями растений табака Inter311 и InterB6 3.3.1, причины которых были исследованы и установлены.

Этот представительный раздел исследований диссидентата убедительно доказал перспективность работ по получению трансгенных растений - стабильных продуцентов интерферона. Табак является модельным растением, поэтому по мнению автора наиболее актуальной является работа на основе видов растений, которые могут использоваться как съедобные вакцины. К таким видам относится вид *D. carota*, морковь. Второй раздел «Результатов» как раз и содержит данные исследований, направленные на создание новых продуцентов интерферона на основе трансгенной моркови, которые в дальнейшем могли бы служить в качестве съедобных иммуномодуляторов для ветеринарии. Этот раздел содержит результаты исследований по созданию генетических конструкций для высокоэффективной тканеспецифичной экспрессии и получению на основе созданных конструкций трансгенных растений моркови. Хотя раздел менее объемен, чем первый,

однако его содержание со всей очевидностью показывает, что диссертант вплотную подошел к решению важнейшей научно-практической задачи по получению массовой продукции рекомбинантного белка в корнях растений для ветеринарии. Демонстрация специфичности экспрессии промотора батата в растениях моркови, впервые полученные данные о существовании в геноме батата гомологичных промоторных участков, существенно различающихся по активности из-за интерции/делеции в 40 пн, позволяют рекомендовать использование для получения растений моркови – продуцентов гамма-интерферона промотора pIbSRD1 без инсерции. Отметим, что все представленные в работе результаты обоснованы и достоверны, поскольку получены с использованием самых современных и эффективных методов генетики и молекулярной биологии с использованием биологических повторностей и статистической обработки.

В разделе «Обсуждение» Бурлаковский М.С. констатирует, что полученные им данные свидетельствуют о стабильном наследовании и экспрессии бычьего гаммаинтерферона на протяжении пяти поколений, который проявляет биологическую активность. «Обсуждение» подчеркивает, что между трансгенными линиями-продуцентами могут существовать большие различия по продуктивности и объясняет эти различия разными сайтами встраивания и копийностью встроившихся трансгенов. Важным достоинством этого раздела является критический анализ полученных данных и содержащиеся в «Заключении» конкретные пути для решения оставшихся вопросов и продолжения работы по созданию растений-продуцентов гамма-интерферона моркови. В «Заключении» диссертант не только подводит итог проведенной работы, но и очерчивает наиболее интересные направления будущих исследований, что говорит об авторе как о состоявшемся исследователе.

Недостатки работы

- 1) Актуальность работы сформулирована не достаточно четко.
- 2) В обзоре практически нет информации о российских разработках по теме диссертации, хотя есть ссылки на работы белорусских коллег. Имеются ли в России внедренные в практику ветеринарии трансгенные растения-продуценты цитокинов?
- 3) Из работы остается не ясным, является ли присутствие двух паралогов (гомеологов или разных аллелей) гена SRD1 особенностью сорта, с которым диссертант работал, или это особенностью вида, которую другие авторы просмотрели? С каким сортом работал диссертант? Отличается ли этот сорт от тех, с которыми работали ранее другие авторы (Baranski et al., 2019; Noh et al., 2012)?

4) Табл. 10 не содержит пояснений по поводу нуклеотидов, отмеченных красным цветом.

В заключении следует отметить, что сделанные замечания не снижают научной и практической ценности проделанной работы. Автором проведена большая квалифицированная работа, которая была начата еще в 2011г. В 2014 г рекомбинантная плазмидная ДНК pART27INT6 и способ получения на её основе инбредной линии растений табака, синтезирующего внутриклеточный гаммаинтерферон быка, были запатентованы. Исследования, проведенные доктором на той же линии, но уже на T4-T5 поколениях, подтвердили стабильность наследования трансгена и сохранение способности линий синтезировать физиологически-активный гамма-интерферон и позволили выяснить причины различий между разными линиями по продукции интерферона. Данные этих исследований опубликованы в виде статей и тезисов, представлены на многих конференциях и съездах. Все представленные в работе результаты обладают научной новизной. Достоверность результатов, а также обоснованность выводов работы не вызывают сомнения. Результаты и выводы из работы Бурлаковского М.С. могут быть использованы в дальнейшей работе по созданию трансгенных растений моркови, производящих гамма-интерфероны для использования в ветеринарии. Перспективность этих исследований убедительно показана в работе.

Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Несомненно, что проделанная работа представляет собой законченное научное исследование и удовлетворяет требованиям, предъявляемым ВАК к кандидатским диссертациям (положения ВАК №842), а ее автор – Бурлаковский М.С. заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 генетика.

Отзыв ведущей организации рассмотрен на заседании кафедры генетики биофака МГУ имени М.В.Ломоносова на заседании кафедры генетики (протокол № 3-20 от 08.05.2020 г).

Отзыв подготовил:

Доктор биологических наук
по специальности 03.02.07 генетика,
профессор кафедры генетики
биологического факультета МГУ

Ежова

Татьяна Анатольевна Ежова

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»,
Адрес: 119991, Российская Федерация, Москва, Ленинские горы, д. 1.

Тел. 8 (495)939-27-29. WWW: www.msu.ru E-mail: info@rector.msu.ru