

ОТЗЫВ

официального оппонента, доктора биологических наук, профессора РАН Косовского Глеба Юрьевича на диссертационную работу Воробьевой Ивы Глебовны по теме: «Разработка маркера селекции и сортировки для быстрого получения клональных линий с планируемой продуктивностью рекомбинантного белка», на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии), представленную в диссертационный совет Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации.

Актуальность избранной темы диссертации. Проблемы создания клеток-продуцентов всегда будут иметь высокую актуальность, возрастающую во времени, в связи с острой необходимостью формирования клеток-продуцентов все новых и новых белков и регуляторных последовательностей РНК. Все большее значение приобретают работы, в которых ведутся фундаментальные исследования по ускорению и увеличению надежности получения различных клеток-продуцентов биологически активных компонент. При создании таких клеточных популяций одним из первых ключевых вопросов является поиск селекционных маркеров, позволяющих быстро и малозатратно отделять клетки, получившие трансформирующую конструкцию, от свободных от нее. Таких селекционных маркеров, традиционно используемых, не очень много, начиная от генов, продукты которых компенсируют дефицит культуральной среды по какому-либо показателю, гены, кодирующие белки флюоресцирующие или прикрепляющиеся к металлическим микрочастицам, кончая ферментами метаболизма различных антибиотиков. В этой связи предлагаемый автором рассматриваемой диссертационной работы оригинальный химерный маркер, основанный на повышенной адгезии клеток к таким субстратам, как титановые кольца и целлюлезная подложка, представляет очевидный интерес.

Степень обоснованности научных положений, выводов и практических рекомендаций. В ходе работы диссертантом Воробьевой И.Г. выполнен анализ отечественной и зарубежной литературы по вопросам создания искусственных генетических конструкций, выделены ключевые проблемы при их формировании, рассматриваются методы подбора селективных и репортерных маркеров, возможные причины низкой эффективности трансфекции клеток млекопитающих и пути их преодоления.

В соответствии с поставленной основной целью работы - создание нового маркера селекции трансфицированных искусственными генными конструкциями клеточных клонов линии клеток яичника китайского хомячка автором сформулировано 5 задач, позволяющих исследовать эффективность подобранных генно-инженерных методов по созданию нескольких генетических конструкций с учетом требований к исключению тех ограничений, которые были рассмотрены в обзоре литературы, а также освоить и использовать набор современных генно-инженерных подходов, основные из которых перечислены в автореферате диссертационной работы. Следует отметить их широкий спектр - в работе применялись молекулярно-генетические методы, методы клеточной инженерии, количественные и качественные методы оценки экспрессии генов: иммуноферментный анализ, проточная цитометрия, методы визуализации экспрессии исследуемых генов.

В результате выполненных Воробьевой И.Г. экспериментальных исследований предложен новый подход к созданию селективных маркеров для отбора клеток линий СНО (яичника китайского хомячка), трансфицированных искусственными генетическими конструкциями на основе включения в них нуклеотидных последовательностей, кодирующих химерные белки, способные к адгезии к титановым кольцам и целлюлозной подложке. Выполнен сравнительный анализ предложенного метода отбора трансфицированных клеток с другими способами маркирования клеток – носителей искусственных генных конструкций.

Достоверность и повизна научных положений, выводов и рекомендаций. Достоверность данных, полученных Воробьевой И.Г.,

обусловлена значительным объёмом исследований, проведенных на достаточном количестве материала с использованием широкого спектра методик и протоколов с последующей статистической обработкой, а также результатами прямых экспериментальных сравнений между предложенным диссертантом новым методом селекции трансфицированных клеток по сравнению с применением других селективных маркеров. Логичное и подробно изложенное планирование проведенных экспериментов, а также детальное описание полученных результатов позволили Воробьевой И.Г. представить в диссертационной работе и в опубликованных научных статьях достаточно наглядно экспериментально обоснованные результаты исследований, которые должным образом зарегистрированы и статистически обработаны.

Все научные положения, выводы и практические рекомендации работы хорошо обоснованы и не вызывают сомнений. Основные результаты диссертационной работы прошли научную экспертизу, по теме диссертации опубликовано 9 научных работ, в том числе 4 научных статей – в изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, 1 - в журнале, рекомендованном ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, и 4 - на научных мероприятиях, 2 из которых международные и 2 - российские.

Все этапы исследования выполнены методически корректно, оптимально подобраны методики и методы исследований.

Научная новизна исследований и практическая значимость выводов и рекомендаций заключаются в том, что впервые создан новый селекционный маркер для отбора клеток эукариот, трансфицированных искусственными генетическими конструкциями. С применением включения в генную конструкцию модельных целевых генов экспериментально показана его эффективность. Разработанные технологии использования нового селекционного маркера имеют очевидный потенциал для его применения при создании высокопродуктивных клеточных линий. Результаты сравнения нескольких систем отбора трансфицированных клеточных популяций

свидетельствуют о перспективности использования модифицированной системы селекции, которая может способствовать сокращению времени селекции и расходных материалов. Полученные данные могут применяться при отборе клеток линии СНО, трансфицированных генетическими конструкциями. Таким образом, результаты проведенных исследований имеют очевидные перспективы для прикладного внедрения при получении новых клеточных линий продуцентов биологически активных веществ.

Соответствие диссертации и автореферата критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней». Диссертация Воробьевой И.Г. является завершенным исследованием, обладает внутренним единством и содержит новые научные результаты и положения, выносимые на защиту. Автором сформулированы конкретные практические рекомендации по использованию полученных результатов в работе по созданию клеточных популяций - продуцентов биологически активных веществ на основе СНО. Автореферат оформлен методически верно, содержит основные разделы диссертации и раскрывает ее научные положения. Выводы и практические предложения, изложенные в автореферате и диссертации, идентичны. Диссертация и автореферат соответствуют критериям «Положения о порядке присуждения ученых степеней».

Полнота опубликованных результатов. Основные результаты диссертационной работы опубликованы в 9-ти научных работах, в том числе в 4-х научных статьях в изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus, 1 - в журнале, рекомендованном ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации, и 4 – в материалах научных конференций (2 - международные и 2 – российские).

Оценка личного вклада соискателя в разработку научной проблемы, репрезентативность эмпирического материала. Диссертационная работа выполнена на необходимом научном и методическом уровне, написана грамотным научным языком, самостоятельно автором. Судя по представленным данным, диссертантом Воробьевой Т.Г. самостоятельно

сформулированы и обоснованы цели и задачи, выбраны методы исследования, проведены анализ и обобщение полученных результатов. Экспериментальная часть, практическая реализация и изложение в опубликованных работах полученных результатов исследований выполнены при личном участии диссертанта.

Оценка содержания и завершенности диссертации. Диссертация Воробьевой И.Г. содержит следующие основные разделы: Введение, Обзор литературы, Описание материалов и методов, Результаты исследований и их обсуждение, Заключение, Выводы и Список цитируемой литературы, включающий 180 печатных источников, 176 из которых англоязычные. Диссертация изложена на 116 страницах машинописного текста и содержит 12 таблиц и 17 рисунков.

Во введении автор кратко излагает актуальность исследования, цель, задачи, освещает новизну и практическую значимость полученных данных.

В Главе 1 представлен обзор литературы, в котором рассматриваются проблемы создания генных конструкций, источники их возможных дефектов, влияющих на экспрессию, методы увеличения экспрессии целевых генов. Рассматриваются современные методы редактирования генов. Обсуждается перспективность разных приемов увеличения экспрессии соответствующих генов путем объединения регуляции экспрессии целевого гена и селективного маркера. Представлены данные о зависимости интенсивности продукции от особенностей метаболизма клеток-продуцентов, характеристик репортерных и селективных маркеров. Обсуждаются методы селекции трансформированных клеток, в частности, использование в качестве селективного маркера химерного белка, способного прикрепляться к магнитным шарикам, что позволяет облегчать их отбор в магнитном поле.

В Главе 2 последовательно излагаются методы, которые автор использовал в своей работе, начиная от синтеза нескольких генных конструкций, ПЦР и получения кДНК для анализа экспрессии генов конструкции, трансфекции,

иммуноферментного анализа, культивирования и клонирования клеток и проточной цитометрии.

В Главе 3 представлены собственные данные по созданию и контролю генных конструкций, продуцирующих на плазматической мембране химерный белок, способствующий адгезии клеток к искусственным субстратам.

В Главе 4 рассматривается эффективность использования в генных конструкциях скэффолд- и матрикс- ассоциированных районов, представлена экспериментально полученная доказательная база эффективности их применения для увеличения интенсивности экспрессии целевых генов.

В Главе 5 приводятся собственные экспериментальные данные по оценкам эффективности использования нового селекционного маркера – химерного белка, способствующего адгезии клеток на титановых кольцах и целлюлезной подложке. Обсуждается динамика эффективности адгезии после трансфекции, вовлечение в нее нетрансфицированных клеток и возможные причины угнетения адгезии.

В Главе 6 выполнено сравнение результатов использования нового селективного маркера с применением ряда других селективных маркеров.

Далее представлен раздел «Заключение», в котором излагается краткий обзор работы, в котором изложена логика выполненных этапов исследований, полученные результаты и перспективы их использования.

Завершается рукопись пятью выводами, рекомендациями по использованию полученных результатов и списком цитируемой литературы.

Содержание работы соответствует теме диссертации, выводы согласуются с поставленными задачами, содержание автореферата соответствует положениям диссертации.

Наряду с положительной оценкой диссертационной работы Воробьевой И.Г., считаю возможным обратить внимание на некоторые замечания и высказать отдельные пожелания.

1. Необходимо отметить определенную небрежность в оформлении рукописи диссертации.

Так, на с. 13-14 рукописи один и тот же абзац повторен дважды («Кроме моделирования хроматина, MAR элементы...»). В ряде предложений автор пропускает слова, что приводит к утрате смыслового содержания (с.22 – «Рисунок 2 (оригинал рисунка на сайте...»); с. 67 – «Поскольку число клеток, попавших в лунку, подчиняется распределению Пуассона, то вероятность отсутствия клональности.»; с. 71 – «И генно-инженерная конструкция, содержащая кроме гена устойчивости к антибиотику элементы раскрывающие хроматин.»; с. 73 – «Через две недели, в лунках где в транзиторно трансфецированном пуле были клетки со встроившейся в геном генной кассетой, наблюдали устойчивого к генетицину клеточного пула.»; с.83 – «Обеднение исходного трансфицированного пула при переносе сорбента со связанными клетками в свежую среду.»; с. 93 – «в течение всего периода селекции. ованном пуле pCBD-EYFP+ в присутствии антибиотика Для...» и в ряде других случаев. Эта странная особенность стилистики автора воспроизводится и в автореферате. Так, на с. 9 снова можно прочесть то же самое предложение: «Поскольку число клеток, попавших в лунку, подчиняется распределению Пуассона, то вероятность отсутствия клональности.».

Неудачны названия некоторых подразделов, например: «Последовательность ДНК, к которой присоединяется ядерный скелет клетки, поддерживает транскрипционно активную структуру хроматина». Не очень понятно, кто кого поддерживает. В отдельных случаях даже в названиях подразделов наблюдаются орфографические ошибки, например: «5.4 Заключение к главе 5», с. 92.

Наблюдается нарушение правил расшифровки используемых терминов. Так, например, на с. 5 написано, что в работе использована технология «r-hook», а расшифровка термина приводится на с.56.

2. В ряде случаев автор приводит достаточно дискуссионные утверждения.

Так, в разделе «Введение» с одной стороны пишется о том, что геномная нестабильность клеток СНО является положительным качеством для получения клеток-продуцентов, а в следующем абзаце о том, как важно получать стабильные клеточные клоны (с.5).

На с. 26 автор пишет: «Ген-таргетинг, это программируемое целевое изменение клетки-хозяина, благодаря гомологичной рекомбинации. Этот вид рекомбинации практически не происходит в клетках высших эукариот.». А как же генная конверсия между генами, кодирующими рибосомальную РНК, или, например, гены амилазы у дрозофилы и так далее?

3. В подразделе «Векторы для гомологичной рекомбинации» довольно странно определяются некоторые инструменты геномного редактирования, такие как TALEN, CRISPR – как эффекторные нуклеазы.

В то же время, главное для этих конструкций – это точность их адреса к конкретным нуклеотидным последовательностям. Не в том дело, что они несут нуклеазы, а в том – что в случае TALEN воспроизводится способ аминокислотной кодировки для опознавания белками – факторами регуляции транскрипции – конкретной последовательности нуклеотидов, в случае CRISPR – способ создания адреса, задаваемого направляющей РНК, к последовательности нуклеотидов, который используется у прокариот для защиты от бактериофагов.

Неточности в описании этих методов обнаруживаются и в следующем подразделе «Системы адаптивного иммунитета бактерий и их применение для рекомбинации у высших эукариот». Например, автор пишет: «Crispr локусы, как правило, состоят из кластерных наборов генов Cas3 или Cas 9 и серий повторяющихся последовательностей – прямые повторы, перемежающихся переменными последовательностями – спейсерами.». На счет прямых повторов ошибочность этого утверждения понятна уже из самой расшифровки названия – Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats (кластеры коротких палиндромных повторов). Очевидно, что палиндромы к прямым повторам не относятся.

4. Не совсем ясно, зачем включены в обзор литературы разделы, в которых описываются методы, не используемые автором в работе, в частности, создание искусственных хромосом, методы геномного редактирования, очевидно, не близкие автору.

Имело бы смысл их рассматривать в том случае, когда обосновываются преимущества методов, выбранных автором, однако такого сравнения нет.

5. Обращает на себя внимание некоторая неопределенность результативности использования нового селективного маркера для увеличения адгезивности к кольцам титана. Так, на с. 83 автор пишет: «На 2-е сутки инкубации разница в связывании клеток с высокой экспрессией трансгена и нетрансфицированных клеток уже визуально не регистрировалась...». Предложены два варианта объяснения – это увеличение выброса в среду клетками кадгеринов и каких-то неопределенных глобулярных белков.

О чем идет речь? Об увеличении межклеточных контактов между трансфицированными клетками и нетрансфицированными? А как же тогда с контактным торможением деления клеток и перспективами продолжительности использования клеточных популяций, экспрессирующих этот новый селекционный маркер? Почему отбор на целлюлезной подложке усиливается в присутствии достаточно больших доз антибиотика генетицина? Почему не приводятся данные о доле гибнущих клеток в разных условиях их культивирования?

6. Хотелось бы понять, какое отношение к тематике диссертации имеет статья «Регуляция пролиферации гепатоцитов после субтотальной резекции печени крыс», приведенная автором в автореферате как научная публикация, в которой представлены данные, включенные в диссертационную работу? Как информация о задержке вступления гепатоцитов в клеточный цикл после 80% гепатэктомии по сравнению с 40% гепатэктомией помогли автору решить поставленные в диссертационной работе задачи?

Отмеченные замечания и вопросы в целом не влияют на положительную оценку диссертационной работы, имеющую важное прикладное значение для разработки лекарственных средств.

Заключение

Диссертационная работа Воробьевой Ивы Глебовны «Разработка маркера селекции и сортировки для быстрого получения клональных линий с планируемой продуктивностью рекомбинантного белка» является научно-квалификационной

работой, в которой содержится решение важной для отечественного здравоохранения задачи, направленной на создание новых селекционных маркеров для сокращения времени и затратности отбора клеток, несущих искусственные генные конструкции.

По актуальности избранной темы, объему и методическому уровню проведенных исследований, научной новизне, теоретической и практической значимости полученных результатов данная работа, в целом, соответствует требованиям пунктов 9-10 Положения о присуждении ученых степеней, утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842, с изменениями, опубликованными в Постановлениях Правительства РФ от 24.04.2016 г. № 335, от 02.06.2016 г. № 748, от 29.05.2017 г. № 650, от 28.08.2017 г. № 1024, от 01.10.2018 г. № 1168, предъявляемым к кандидатским диссертациям, а её автор, Воробьева Ива Глебовна заслуживает присуждения учёной степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии).

Официальный оппонент:
Гражданин Российской Федерации
Доктор биологических наук
(по специальности 03.01.06 – Биотехнология
(в том числе бионанотехнологии)),
профессор РАН, директор
Федеральное государственное бюджетное научное
учреждение «Научно-исследовательский
институт пушного звероводства и
кролиководства имени В. А. Афанасьева»,
(ФГБНУ НИИПЗК)
Почтовый адрес: 119618, г. Москва,
ул. Главмосстроя, д. 10, кв. 177
Телефон: 89857614511
E- mail: gkosovsky@mail.ru

«24» мая 2021 г.

Подпись доктора биологических наук, профессора РАН Косовского Глеба Юрьевича
заверяю:

Начальник отдела кадров ФГБНУ НИИПЗК

Г. Ю. Косовский

О.Е. Блохнова

