

ОТЗЫВ

официального оппонента доктора биологических наук доцента А.В. Кочетова о диссертационной работе Серёгина Сергея Викторовича на тему «ОПТИМИЗАЦИЯ КОНСТРУКЦИЙ РЕКОМБИНАНТНЫХ ДНК ДЛЯ ПОЛУЧЕНИЯ ИММУНОБИОЛОГИЧЕСКИХ ПРЕПАРАТОВ», представленной на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертация С.В. Серёгина посвящена разработке и использованию методов генной инженерии для решения широкого круга актуальных задач в области молекулярной биологии, вирусологии, иммунологии и медицины. Актуальность этого направления обусловлена ключевыми возможностями генной инженерии – без применения этих подходов достижение современного уровня развития биологии было бы абсолютно невозможно. В диссертационной работе представлены генно-инженерные решения, разработанные автором для проведения исследований в различных областях биологии, давших целый ряд значимых результатов фундаментального и прикладного характера, что позволяет определить тему работы как безусловно актуальную.

Диссертация С.В. Серёгина имеет общий объем в 311 страниц, включая 65 рисунков и 11 таблиц, построена по традиционной схеме: «1 Список сокращений» (2 стр.), «2 Общая характеристика работы» (11 стр.), «3 Обзор литературы» (85 стр.), «4 Материалы и методы исследования» (34 стр.), «5 Результаты и обсуждение» (106 стр.), «6 Заключение» (3 стр.), «7 Выводы» (2 стр.). Список литературы содержит 532 источника, в том числе в отечественных изданиях – 74. Результаты работы доложены на многочисленных отечественных и международных научных конференциях. По теме диссертации автор опубликовал 66 печатных работ, в том числе 35 статей в журналах, рекомендуемых ВАК (12 – в международных изданиях), получено 8 патентов.

В разделе «Общая характеристика работы» автор обосновал актуальность своей работы, конкретизировав ее цель как «конструирование рекомбинантных векторных плазмид, обеспечивающих эффективность клонирования и экспрессии различных генов, получение на их основе оригинальных рекомбинантных плазмид, направляющих в бактериальных клетках синтез ряда природных, мутантных и химерных иммуномодуляторов; создание и оптимизация серии генетических конструкций, предназначенных для получения перспективных ДНК-вакцинных препаратов против ВИЧ/СПИД и ККГЛ, а также разработка современных методов экспресс-диагностики

ККГЛ и генотипирования вируса ККГЛ в биологических образцах». Сформулированы 7 основных задач, которые необходимо было решить для достижения поставленной цели. Следует отметить, что существенная часть результатов, представленных в диссертационной работе С.В. Серегина, была получена в конце 80-х –90-х годах прошлого века. Применение генетических конструкций для суперпродукции и выделения белков в очищенном виде во многих случаях было просто необходимо для решения поставленных в научной работе задач. Однако, инструментарий генной инженерии был разработан еще очень слабо и планирование эксперимента по созданию целевой генетической конструкции часто требовало разработки сложных поэтапных схем клонирования, при этом конечный результат (получение белка) был совсем не гарантирован. Для эффективного планирования генно-инженерных экспериментов требовались знания о сигналах, регулирующих экспрессию гена на уровне транскрипции и трансляции и влияющих на стабильность мРНК, учет особенностей штамма организма-продуцента, данные о детерминантах функциональной активности в структуре молекулы нарабатываемого белка, то есть получение эффективного суперпродуцента не было задачей только технической, но часто требовало творческой разработки нетривиальных подходов, получения и анализа промежуточных вариантов и их экспериментальной оценки для последующей оптимизации структуры целевых генетических конструкций. Работа С.В. Серегина является примером именно такой разработки и применения авторских генно-инженерных технологий для решения актуальных задач в разных областях биологии. Такое смысловое содержание работы сказывается на стиле и форме представления результатов в диссертации – в частности, в разнообразии (и даже разнородности) биологических задач, решаемых с помощью генетических конструкций, а также в необходимости включения в работу многочисленных методических и технических деталей. С учетом этой особенности диссертационной работы такие формулировки поставленных задач можно считать оправданными, равно как и положения, выносимые на защиту – они сформулированы адекватно и соответствуют теоретической и научно-практической значимости работы.

Замечания:

Вряд ли можно согласиться с автором в том, что использование ДНК-вакцин является новейшим подходом к иммунопрофилактике, поскольку этот вариант был предложен много лет назад. Также вряд ли ДНК-вакцины можно считать полностью безопасными, как это утверждается в данном разделе работы – проникновение любой чужеродной ДНК в ядро клеток (что необходимо для транскрипции генетической конструкции) может привести к неспецифическому встраиванию в геномную ДНК и различным проявлениям инсерционного мутагенеза. По-видимому, более безопасными в этом плане и более современными являются РНК-вакцины.

В разделе «3 Обзор литературы» автор рассматривает два направления – методы генной инженерии (3.1) и перспективы применения ДНК-вакцин (3.2). Раздел 3.1 представляет в основном базовую (учебную) информацию о методах, имеющих отношение к работе автора и связанных с ними молекулярно-генетических и молекулярно-биологических процессах (надо отметить, что автор честно предупреждает об этом на стр. 22 и отсылает читателя к другим источникам для получения дополнительных сведений). Наверное, можно согласиться с тем, что указанная проблематика чрезвычайно широка и привести полномасштабный обзор по этой теме невозможно. Однако, было бы, наверное, правильно, если бы автор привел краткое описание современных возможностей и достижений в области генно-инженерных подходов. Также приведено описание плазмидных векторов для клонирования и экспрессии трансгенов в бактериях в некоторой исторической ретроспективе (pBR322, PUC18 и др.), промоторов и штаммов *E. coli*. Нужно отметить, что цитируются в основном не самые последние литературные источники.

В разделе 3.2 помимо базовой информации приведено описание современных достижений в этой области науки, а также особенности проблематики разработки вакцин против ВИЧ/СПИД. В целом, этот раздел представляется более удачным и информативным, несмотря на некоторую эклектичность.

Замечания:

Присутствует небольшое количество не вполне удачных выражений и определений («типичное строение двух видов терминаторов транскрипции на языке РНК» стр.66 – непонятен смысл, «кодоновый состав» - правильное «кодонный» (стр. 72) и т.п.).

Подписи к рисункам и таблицам во многих случаях крайне лаконичны и для того, чтобы в них разобраться, нужно обращаться к тексту. Тем не менее, разобраться можно и обзор достаточно информативный. В диссертационных работах часто приводят заключение по обзору литературы, суммирующее и акцентирующее актуальность поставленных автором целей и задач (в контексте имеющейся информации) – в работе С.В. Серегина такого раздела нет, а он также мог бы улучшить представление материала.

Раздел «4 Материалы и методы» разбит на две части, посвященные собственно материалам и методам. Раздел написан достаточно подробно, информативен. Следует отметить одну особенность, также, по-видимому, связанную со спецификой диссертационной работы С.В. Серегина: в подразделе 4.2.2. «Частные методики исследований» на самом деле описана существенная часть результатов. Это не является обычной ситуацией, так как в этом разделе приводятся описания методов, а не то, что с их помощью было сделано. Однако, в этом есть, наверное, смысл – характер работы таков,

что описание деталей конструирования заняло бы очень большой объем в разделе «Результаты и обсуждение», что могло бы сильно затруднить восприятие.

Замечания:

Присутствует небольшое количество опечаток, не вполне удачных выражений и определений (название раздела 4.2.2.8 «Реконструкция плазмид...» - понятие реконструкции может иметь разные смысловые оттенки, например «воссоздание на основе имеющихся неполных данных», лучше было бы употребить термин «модификация»).

Раздел «5 Результаты и обсуждение»

В рамках работы были разработаны высокоэффективные векторы для экспрессии рекомбинантных белков в про- и эукариотических клетках, а также созданы генетические конструкции для получения очищенных препаратов ряда биологически активных белков, кандидатных ДНК-вакцин и экспресс-диагностики вирусных заболеваний. В частности, были собраны нуклеотидные последовательности нативной и мутантных форм интерлейкина 2 человека, получен набор генетических конструкций и бактериальные продуценты. Следует отметить удачное использование промотора *recA* и терминатора транскрипции, позволившее получить высокий уровень экспрессии генов различного происхождения.

Нужно сказать, что экспрессия гетерологичных генов часто малоэффективна и использование аутентичных регуляторных последовательностей помогает далеко не всегда. Важную роль играет комбинация различных факторов (вторичная структура РНК может интерферировать с сайтом Шайна-Дальгарно и снижать инициацию трансляции, задержка рибосом на кластерах редких синонимических кодонов также может вызывать реконфигурацию РНК и снижать экспрессию, белки могут быть токсичны для клеток, комбинации нуклеотидов в чужеродной структуре гена могут имитировать сигналы экспрессии (паразитные промоторы, сайты дестабилизации РНК и т.п.). В целом, ситуации с проблематичной экспрессией чужеродных генов не редки и сейчас, хотя арсенал генной инженерии очень велик и имеющиеся возможности весьма разнообразны и широки. На момент выполнения работы таких возможностей не было и решение каждой задачи по созданию экспрессионной генетической конструкции требовало авторского подхода и по получению ДНК трансгена, и по оптимизации его структуры для достижения достаточного уровня экспрессии. В этой части работы С.В. Серегиним предложена удачная комбинация сильного индуцибельного промотора с хорошим соотношением уровней транскрипции в фоне и после индукции с терминатором транскрипции (стабильной вторичной структуры РНК). В целом, это замечательный образец успешной генно-инженерной работы, внесшей вклад и в развитие методической базы (была создана

высокотехнологичная плазмида для получения бактериальных суперпродуцентов, описанная далее в разделе 5.4), и в решение конкретных задач по исследованию функций и свойств IL-2, а также его химерных и мутантных вариантов со специфическими и потенциально полезными для медицины свойствами. В каждом случае автором были разработаны оригинальные схемы создания генетических конструкций, основанные на глубоком понимании существующих на данный момент методических возможностей и знании тонкой организации сигналов экспрессии генов прокариот. Аналогичным образом были решены задачи по клонированию и экспрессии в бактериях гена анафилотоксина С5а человека (раздел 5.3), генов вируса натуральной оспы, кодирующих гомологи рецептора гамма-интерферона человека (раздел 5.5), синтетического гена ангиогенина человека (раздел 5.6). В ряде случаев с помощью этих конструкций были получены интересные биологические результаты фундаментального характера.

Замечания по данной части работы:

Мне не вполне понятно, почему автор расположил «шпилечные структуры» непосредственно после стоп-кодона (рис. 5.7). А-сайт рибосомы расположен в районе центра и для достижения стоп кодона и терминции трансляции ей необходимо расплести часть шпильки, что могло снизить скорость трансляции 3'-конца рамки считывания. Более логично было бы расположить вторичную структуру на некотором расстоянии от терминатора трансляции. Кроме того, желательно различать предсказанные вторичные структуры РНК и подтвержденные экспериментально (например, нуклеазным картированием) – в данном случае использованные автором формулировки этого не позволяют. Предсказания обычно не точны, более того – РНК в растворе часто присутствует в виде популяции субоптимальных конформеров по вторичной структуре, на соотношение которых влияет целый ряд различных факторов (инвариантные структуры редки).

В разделе 5.7. приведено описание сложного конструирования очень интересного искусственного гена (ТСІ), кодирующего полиэпитопный белок ВИЧ-1. Белок был разработан на основе анализа структуры белков различных вариантов вируса. Автором была предложена красивая схема сборки и конструирования, осуществлено получение продуцента и доказана специфическая иммуногенность продукта экспрессии искусственного гена ТСІ. В разделе 5.7.4 приведено описание переноса гена ТСІ в конструкцию, предназначенную для экспрессии в клетках эукариот, для чего были выбраны сильные вирусные промоторы и проведена оптимизация контекста стартового кодона трансляции по эукариотическому типу – это было использовано для разработки кандидатной ДНК-вакцины, направленной, в основном, на активацию цитотоксических Т-лимфоцитов.

В разделе 5.8 представлен один из наиболее ярких результатов диссертационной работы – создание генетических конструкций для эффективной экспрессии полиэпитопных иммуногенов, для чего были использованы различные варианты сигналов и элементов, обеспечивающих либо последовательное расположение эпитопов без фланкирующих районов, либо варианты фланкирующих районов с облегченным протеасомным расщеплением антигенных детерминант, а также с дополнительными мотивами для распознавания ТАР-белками. Работоспособность конструкций была проверена на примере полиэпитопных конструкций вируса ВИЧ-1 и было найдено, что убиквитин-зависимый таргетинг полиэпитопной конструкции в протеасому, оптимизация протеасомного расщепления и присутствие сайтов связывания эпитопов с ТАР-белками усиливают их иммуногенность.

В разделе 5.9 приведены генетические конструкции, разработанные для иммунопрофилактики и диагностики Крымской-Конго геморрагической лихорадки (ККГЛ). В работе представлены результаты по получению продуцентов белков вируса, анализ их иммуногенности и перспектив использования для диагностики. Автором было обнаружено, что вариант ИФА обладает низкой эффективностью – по-видимому, вследствие специфических структурных особенностей вирусных белков, поэтому для решения этой задачи был вполне успешно использован метод ОТ-ПЦР. Был также разработан метод генетической дифференциации различных биовариантов вируса ККГЛ на основе ПДРФ фрагмента, полученного на матрице большого сегмента генома, полученного методом ОТ-ПЦР. Наконец, были разработаны перспективные варианты ДНК-вакцин против этого опасного патогена, основанные на авторских векторных генетических конструкциях (раздел 5.8). Выполнение этой части работы потребовало детального анализа особенностей организации генома вируса ККГЛ и иммуногенности кодируемых им белков.

Замечания по данной части работы:

Не вполне понятно, почему автор при оптимизации экспрессии генетических конструкторов в клетках эукариот ограничился только контекстом стартового кодона AUG. В таких ситуациях обычно смотрят стабильность вторичной структуры РНК в районе 5'-НТП, а также размер лидерной последовательности (он не должен быть меньше 15 нуклеотидов, так как возможен «проскок» рибосомами сайта инициации трансляции вследствие стерических ограничений). Полагаю, что учет дополнительных критериев оптимизации мог бы дополнительно увеличить эффективность синтеза иммуногенного белка, если, конечно, такая необходимость есть.

В разделе «6 Заключение» кратко суммировано обсуждение результатов. Собственно эти данные и стали основой раздела «Выводы». Их - 6. Они адекватны представленным результатам и хорошо обоснованы в тексте диссертации.

Заключение:

В целом, результаты исследований, полученные Сергеем Викторовичем Серегиним, имеют большое значение для развития методической базы генной инженерии (в части векторов для получения суперпродуцентов и ДНК-вакцин), а также для решения ряда актуальных задач вирусологии и медицины. Это законченная научно-квалификационная работа, новизна и значимость которой не вызывают сомнений. Полученные результаты являются новыми и выводы диссертации вытекают из полученных результатов. Автореферат отражает содержание работы. Материал диссертации соответствует указанной специальности. Диссертация апробирована на многих конференциях, результаты опубликованы в авторитетных отечественных и международных научных журналах. Таким образом, диссертационная работа С.В. Серегина полностью соответствует требованиям ВАК, предъявляемым к докторским диссертациям (пп. 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней» за №842 от 245 сентября 2013 г.), а ее автор заслуживает присуждения искомой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология.

доктор биологических наук, доцент
Заведующий лабораторией генной инженерии,
заместитель директора по научной работе



А.В. Кочетов

ФГБНУ «Федеральный исследовательский
центр Институт цитологии и генетики
Сибирского отделения Российской академии наук»
(ИЦиГ СО РАН)

630090 г. Новосибирск пр. академика Лаврентьева, 10

Тел. 8383-3634994, +7913-7449511

ak@bionet.nsc.ru

09.10.2015

