

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,**  
созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А.  
Овчинникова Российской академии наук  
по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 14 октября 2020 № 29

О присуждении **Мышкиной Надежде Михайловне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Создание автономно светящихся эукариот, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты» по специальности 03.01.03 - молекулярная биология принята к защите 10 июня 2020 г., (протокол заседания №19) диссертационным советом Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, (117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15 февраля 2013 года.

Соискатель Мышкина Надежда Михайловна (девичья фамилия Маркина), 1991 года рождения, в 2013 году окончила Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова по специальности "Биохимия".

С 2013 по 2017 гг. обучалась в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории химии метаболических путей ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории химии метаболических путей ИБХ РАН.

Научный руководитель – доктор химических наук Ямпольский Илья Викторович, заместитель директора по научной работе, руководитель отдела биомолекулярной химии, заведующий лабораторией химии метаболических путей Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

**Официальные оппоненты:**

**Лось Дмитрий Анатольевич** – доктор биологических наук, член-корреспондент РАН, профессор, директор Федерального государственного бюджетного учреждения

науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН)

**Остерман Илья Андреевич** – доктор химических наук, главный научный сотрудник Центра Наук о жизни, Сколковский институт науки и технологий

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», Московская область, г. Долгопрудный, в своем положительном заключении, подписанном д.б.н., доцентом Лазаревым Василием Николаевичем, утвержденном к.ф.-м.н. Баганом Виталием Анатольевичем, проректором по научной работе Федерального государственного автономного образовательного учреждения высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», указала, что диссертационная работа Мышкиной Надежды Михайловны на тему «Создание автономно светящихся эукариот, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты» является законченным исследованием, выполненным на высоком научном уровне, и соответствует критериям (в том числе п.9), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология."

Соискатель имеет 14 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 3 работы общим объемом 6 печ.л., опубликованные в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Н.М. Мышкина внесла основной вклад:

1. Mitiouchkina T.\*, Mishin A.S.\*, Somermeyer L.G.\*, **Markina N.M.\***, Chepurnyh T.V., Guglya E.B., Karataeva T.A., Palkina K.A., Shakhova E.S., Fakhranurova L.I., Chekova S.V., Tsarkova A.S., Golubev Y.V., Negrebetsky V.V., Dolgushin S.A., Shalaev P.V., Shlykov D., Melnik O.A., Shipunova V.O., Deyev S.M., Bubyrev A.I., Pushin A.S., Choob V.V., Dolgov S.V., Kondrashov F.A., Yampolsky I.V., Sarkisyan K.S. Plants with genetically encoded autoluminescence. // Nat Biotechnol. 2020 Apr 27. 38(8):944-946, doi: 10.1038/s41587-020-0500-9.

\* равный вклад авторов

2. **Markina N.M.**, Kotlobay A.A., Tsarkova A.S. Heterologous metabolic pathways: Strategies for optimal expression in eukaryotic hosts. // Acta Naturae. 2020. Т. 12. № 2 (45). С. 28-39. doi: 10.32607/actanaturae.10966

3. Kotlobay A.A., Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E.O., **Markina N.M.**, Gonzalez Somermeyer L., Gorokhovatsky A.Y., Vvedensky A., Purtov K.V., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Chepurnyh T.V., Fakhranurova L.I., Guglya E.B., Ziganshin R., Tsarkova A.S., Kaskova Z.M., Shender V., Abakumov M., Abakumova T.O., Povolotskaya I.S., Eroshkin F.M., Zaraisky A.G., Mishin A.S., Dolgov S.V., Mitiouchkina T.Y., Kopantzev E.P., Waldenmaier H.E., Oliveira A.G., Oba Y., Barsova E., Bogdanova E.A., Gabaldón T., Stevani C.V., Lukyanov S., Smirnov I.V., Gitelson J.I., Kondrashov F.A., Yampolsky I.V. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. // Proc Natl Acad Sci U S A. 2018 Dec 11. Т. 115(50). С. 12728-12732. doi: 10.1073/pnas.1803615115.

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**Отзыв официального оппонента д.б.н., чл.-корр. РАН, проф. Лося Дмитрия Анатольевича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. Цитата: «Особенно перспективны в виде культуры клеток более примитивные растения: мхи и водоросли» (стр. 31 диссертации). Водоросли, в отличие от водных растений, так никогда и не стали растениями, хотя тоже фотосинтезируют. 2. Названия (аббревиатура) генов избыточны удивительным многообразием (например, *nnluz*, *nnh3h*, *nnhisps* и *npga*). Отчего аббревиатуры разнятся от классических микробиологических четырехбуквенных (*npga*) до неменяемых семибуквенных (*nnhisps*)? 3. Чем можно объяснить разницу в локализации свечения в листьях *N. tabacum* и *N. benthamiana* на рис. 21 диссертации (Рис. 9 автореферата)?

**Отзыв официального оппонента д.х.н., г.н.с. Остермана Ильи Андреевича.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. При проверке дрожжей, содержащих гены *luz*, *h3h*, *hisps* и *npga*, не хватает контроля без добавления оксилуциферина, а при тестировании автономной биолуминесценции – теста на среде без тирозина. 2. В тексте диссертации сказано, что клетки только с геном *nnluz* (при добавлении гиспидина) или с генами *nnhisps* и *npga* по отдельности (при добавлении кофейной кислоты) – сигнала не давали, однако, стоило бы привести изображение этих клеток, полученное в аналогичных с тестируемыми конструкциями условиях. 3. Для окончательного подтверждения функции генов биосинтеза люциферина было бы хорошо продемонстрировать активность данных белков в бесклеточной системе, тогда бы вывод о найденном «цикле кофейной кислоты» бы более строгим. 4. Возможно, стоило подробнее

обосновать выбор тех или иных генетических конструкций для экспрессии в дрожжах, растениях и клетках НЕК293NT. Например, для дрожжей был использован вектор рGAP – почему именно этот? 5. Почему все гены вводились на отдельных плазидах, может стоило протестировать весь оперон целиком, в таком виде как он встречается у природных автономно биолуминесцентных грибов. 6. Аналогичный вопрос касается и конструкции для экспрессии в клетках НЕК293NT – в работе была проведена трансфекция большим набором плазмид, возможно более эффективно было бы объединить гены в одну конструкцию или несколько, чтобы более эффективно провести отбор и гарантировать присутствие всех генов во всех клетках. 7. Для повышения эффективности свечения клеток НЕК293NT можно было также попробовать интегрировать эти гены в геном.

**Отзыв ведущей организации.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1. В работе встречаются стилистические погрешности, а также пунктуационные ошибки. 2. Обзор литературы занимает ровно половину объема диссертационной работы. 3. Нет необходимости введения в текст диссертации раздела 3.5.3.3 «Подбор гетерологической тирозин-аммоний-лиазы в автономно светящейся культуре клеток млекопитающих», в котором эксперименты только запланированы.

**Отзыв на автореферат** кандидата биологических наук, младшего научного сотрудника отдела биокинетики Научно-исследовательского института физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ имени М.В. Ломоносова Астаховой Алины Анатольевны. Отзыв положительный, замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, близких к тематике диссертационной работы, а именно: исследования гетерологической экспрессии генов, исследования физиологии растений и животных, а также работы с природными соединениями, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих научных российских и международных журналах. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской и экспертной работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований впервые разработаны методы создания автономно биолуминесцентных эукариот, что составляет основу для разработки усовершенствованных методов биоимиджинга для исследования физиологии растений, дрожжей и животных. Впервые в мире получены модельные автономно биолуминесцентные организмы, принадлежащие к трём различным царствам живой природы, гетерологически

экспрессирующие гены цикла кофейной кислоты. Кроме того, впервые доказана возможность использования генов цикла кофейной кислоты совместно с вспомогательными генами в гетерологических системах.

Теоретическая значимость диссертационной работы состоит в том, что исследования, проведённые автором, расширяют знания о соответствующих классах белков: описана и подтверждена функция трёх генов гриба *Neonothopanus nambi* (*h3h*, *hisps*, *cph*), кодирующих белки гиспидин-3-гидроксилазу, гиспидинсинтазу и каффеоилпируватгидролазу, соответственно; кроме того, автором доказана необходимость присутствия вспомогательного гена *npga*, кодирующего белок NpgA, и выполняющего функцию фосфопантетеинилирования поликетидсинтаз I типа.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики подтверждается тем, что полученные модельные организмы, в том числе и многоклеточные, способные к автономной биолюминесценции, можно в дальнейшем использовать для исследования особенностей физиологии с помощью методик автолюминесцентного биоимиджинга. Возможность применения в гетерологических системах генов *h3h*, *hisps*, *cph*, кодирующих белки гиспидин-3-гидроксилазу, гиспидинсинтазу и каффеоилпируватгидролазу, соответственно, позволяет использовать эти гены в экспериментах по созданию других автономно биолюминесцентных организмов из царств растений, грибов и животных.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные данные получены с использованием сертифицированного оборудования, показана воспроизводимость результатов в различных условиях. Данные получены альтернативными методами в независимых экспериментах.

Личный вклад Мышкиной Н.М. заключается в планировании, проведении экспериментов, обработке и анализе полученных данных, подготовке публикаций. Основные результаты работы получены лично соискателем, за исключением биоинформатического анализа по определению кластера генов цикла кофейной кислоты и создания конструкции для трансформации растений (проведены совместно с К.С. Саркисяном, зав. группой синтетической биологии ИБХ РАН), экспериментов по введению в геном *P. pastoris* генов *h3h*, *hisps*, *npga* (проведены совместно с Ю.А. Мокрушиной, м.н.с. лаборатория биокатализа ИБХ РАН), экспериментов по имиджингу дрожжей (проведены совместно с М.А. Абакумовым, доцентом кафедры медицинских нанобиотехнологий медико-биологического факультета), и К.А. Береговой, инженером лаб. химии метаболических путей ИБХ РАН), экспериментов по трансформации растений (проведены совместно с Т.Ю. Митюшкиной, с.н.с. лаборатория экспрессионных систем и модификации генома растений), экспериментов по имиджингу растений (проведены совместно с А.С. Мишиным, зав.

группой молекулярных меток для оптической наноскопии ИБХ РАН и Т.В. Чепурных, н.с. лаб. химии метаболических путей ИБХ РАН). Автор лично представлял результаты работы на международных конференциях.

На основании вышеизложенного диссертационный совет заключает, что диссертация Мышкиной Н.М. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой имеют важное значение для развития молекулярной биологии и биотехнологии, в частности создание автономно биолюминесцентных эукариот позволит разработать усовершенствованные методы биоимиджинга для изучения процессов, происходящих в клетках живых организмов. Таким образом, диссертационная работа Мышкиной Надежды Михайловны «Создание автономно светящихся эукариот, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология, соответствует всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650).

На заседании 14 октября 2020 года диссертационный совет принял решение присудить Мышкиной Надежде Михайловне ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 20 человек (из них 6 докторов наук по специальности рассматриваемой диссертации 03.01.03 - молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за - 20, против - 0, недействительных бюллетеней - 0.

Председатель  
диссертационного совета

академик РАН Иванов В.Т.

Ученый секретарь  
диссертационного совета

д.ф.-м.н. Олейников В.А.

15 октября 2020 г.

