

УТВЕРЖДАЮ

Проректор по научной работе
федерального государственного автономного
образовательного учреждения высшего
образования «Московский физико-
технический институт (национальный
исследовательский университет)»



Баган Виталий Анатольевич

сентябре 2020 г.

ОТЗЫВ

ведущей организации на диссертацию Мышкиной Надежды Михайловны
**«Создание автономно светящихся эукариот, экспрессирующих гены цикла кофейной
кислоты»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.01.03 - молекулярная биология

Диссертация Мышкиной Н.М. посвящена созданию автономно биоллюминесцентных эукариот. Биоллюминесценция – свойство живых организмов испускать излучение в видимом диапазоне спектра, присущее разнообразным представителям таких царств живых организмов, как бактерии, грибы и животные. Значительная часть биоллюминесцентных реакций в природе осуществляется за счёт взаимодействия фермента люциферазы и низкомолекулярного субстрата люциферина, биосинтез которого также осуществляется ферментативно.

С точки зрения биотехнологии и прикладных методов молекулярной биологии биоллюминесценция крайне важна, поскольку позволяет визуализировать на микроскопическом и макроскопическом уровнях процессы, происходящие в живых клетках. Однако непосредственно люциферин-люциферазная реакция обладает серьёзным недостатком при практическом применении, поскольку для её прохождения необходимо добавлять люциферин извне, что может быть технически затруднительной, а также дорогостоящей процедурой.

Для преодоления этого затруднения подходят автономные биоллюминесцентные реакции, при которых биосинтез люциферина осуществляется непосредственно в исследуемом объекте, однако до недавнего времени была описана только ферментативная система бактерий, пригодная для создания автономно биоллюминесцентных модельных объектов. Данная система может оказывать токсичное воздействие на исследуемый организм, а кроме того максимум испускаемого свечения составляет порядка 490 нм, что находится в диапазоне поглощения различными биологическими тканями.

Таким образом, существует потребность в автономно биоллюминесцентной системе с альтернативным субстратом и другим спектром излучения для расширения инструментария молекулярной биологии и биотехнологии.

В своей работе Мышкина Н.М. поставила целью проверку возможности создания автономно светящихся эукариот с помощью введения гетерологических генов цикла кофейной кислоты, обнаруженных в высших билюминесцентных грибах.

Для достижения цели автор сформулировал задачи, как фундаментальные, к которым относится поиск ферментов биосинтеза люциферина грибов и подтверждение их функции, так и прикладные, включающие в себя создание автономно билюминесцентных дрожжей, растений и культуры клеток млекопитающих, а также пространственный и временной анализ свечения автономно билюминесцентных растений.

В диссертационной работе Мышкина Н.М. описывает обнаружение кластера генов, кодирующих ферменты биосинтеза люциферина, в геноме билюминесцентного гриба *Neonothopanus nambi*. Автор приводит описание экспериментов, подтверждающих функцию продуктов данных генов в модельном объекте – дрожжах *Pichia pastoris*. В частности, описываются фермент гиспидин-3-гидроксилаза (H3H), катализирующий реакцию превращения гиспидина в люциферин грибов, и кодирующий его ген *h3h*; фермент кафеоилпируватгидролаза (CPH), катализирующий реакцию превращения оксильюциферина грибов в кофейную кислоту, и кодирующий его ген *cph*; а также фермент гиспидинсинтаза (HispS), катализирующая биосинтез гиспидина из кофейной кислоты и малонил-КоА, и кодирующий его ген *hisps*. Кроме того, автор описывает и подтверждает необходимость введения в систему фермента фософантетеинил-трансферазы *Aspergillus nidulans* (*npgA*), кодируемого геном *npga*, для активации гиспидинсинтазы. Гены *h3h*, *hisps*, *cph* и описанный ранее ген люциферазы грибов (*luz*) автор объединяет под названием «гены цикла кофейной кислоты».

Далее автор описывает создание автономно билюминесцентных дрожжей *Pichia pastoris*, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты и вспомогательные гены *hprab*, *hprac* и *rctal*, которые кодируют ферменты HpaB, HpaC и RcTAL, соответственно, осуществляющие превращение аминокислоты тирозин в кофейную кислоту (ранний предшественник люциферина грибов).

В следующем разделе Мышкина Н.М. описывает создание автономно билюминесцентных растений двух видов рода *Nicotiana* (*N. tabacum* и *N. banthamiana*) с помощью введения в них генов цикла кофейной кислоты. Согласно работе полученные растения видны в темноте невооружённым глазом, а также могут быть сфотографированы на камеру смартфона. Автор также описывает суточные колебания в свечении растений и связывает их с общим изменением уровня метаболизма растений и количественно определяет наиболее ярко светящиеся органы и ткани растения, к которым относятся цветки и каллусы.

Наконец, Мышкина Н.М. описывает создание автономно светящейся культуры клеток млекопитающих НЕК293NT, временно экспрессирующих гены цикла кофейной

кислоты и вспомогательные гены *npga*, *hpab*, *hpac* и *rctal*. Также автор отмечает нестабильность автономно биолюминесцентного сигнала и предлагает шаги по оптимизации данной системы с помощью замены генов *hpab*, *hpac* и *rctal* на гены *sec3h* и *setal*, кодирующие кумарат-3-гидроксилазу и тирозин-аммоний-лиазу *Saccharothrix espanaensis*, соответственно.

В работе Мышкиной Н.М. впервые описаны ферменты биосинтеза люциферина грибов и показана их применимость для создания автономно биолюминесцентных модельных объектов, принадлежащих разным царствам живой природы, таким как дрожжи, растения и животные, в том числе, описано создание многоклеточных автономно биолюминесцентных организмов – высших растений рода *Nicotiana*.

Работа написана по классическому плану, изложена на 139 страницах и состоит из введения, списка сокращений, обзора литературы, материалов и методов, результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы, включающего 252 ссылки. Работа содержит 28 рисунков, 2 таблицы и 3 приложения.

Обзор литературы в целом посвящён гетерологической экспрессии биохимических путей, охватывает такие аспекты, как стратегии поиска метаболических путей, подбор организма-хозяина для гетерологической экспрессии, выбор способа переноса генов метаболического пути, основные источники метаболических путей и подходы к оптимизации работы гетерологического метаболического пути. Обзор литературы написан подробно и даёт возможность даже непосвящённому читателю глубоко ознакомиться с данным вопросом.

Автор подробно описывает в соответствующем разделе большое количество разнообразных экспериментальных подходов, использованных в работе, что свидетельствует о высокой профессиональной подготовке Мышкиной Н.М.

В разделе «Результаты и обсуждения» Мышкина Н.М. описывает результаты проведенных экспериментов и приводит их интерпретацию. Результаты хорошо структурированы и проиллюстрированы рисунками и таблицами.

Основные результаты и выводы по диссертации Мышкиной Н.М. опубликованы в 3 статьях в международных журналах, входящих в перечень научных изданий, рекомендованных Министерством науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования результатов диссертаций, а также доложены соискателем лично на 3 научных конференциях. Рукопись автореферата полностью и точно отражает содержание диссертации.

Принципиальных замечаний по работе не имеется. Есть несколько моментов, на которые хотелось бы обратить внимание диссертанта.

В работе встречаются стилистические погрешности, а также пунктуационные ошибки.

Обзор литературы, как было указано выше, дает полное представление об объектах исследования, стилистически хорошо написан, однако, занимает ровно половину объема диссертационной работы.

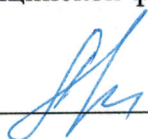
Экспериментальный материал диссертации более чем превосходит требования к квалификационным работам, поэтому нет необходимости введения в текст диссертации раздела 3.5.3.3 «Подбор гетерологической тирозин-аммоний-лиазы в автономно светящейся культуре клеток млекопитающих», в котором эксперименты только запланированы.

Отмеченные выше замечания не снижают общего впечатления о работе как о квалифицированном научном труде высокого уровня.

Результаты данной работы имеют важное значение для биологической и медицинской физики и могут быть практически применены, например, при создании сенсоров на лекарственные средства и моделей опухолей.

На основании всего вышеизложенного можно заключить, 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."

Отзыв на диссертацию обсуждён и одобрен на расширенном научном семинаре кафедры молекулярной и трансляционной медицины Физтех-школы биологической и медицинской физики МФТИ «10» августа 2020 г., протокол № 01/08.



Лазарев Василий Николаевич

Доктор биологических наук, доцент

Почтовый адрес: 141700, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский пер.,9

Телефон: 8 (499) 255-28-46

Адрес электронной почты: lazar0@mail.ru

Организация – место работы: Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)», кафедра молекулярной и трансляционной медицины ФБМФ

Должность: заместитель заведующего кафедрой

Web-сайт организации: <https://mipt.ru/>

Подпись д.б.н. Лазарева В.Н. заверяю.

Ученый секретарь ФГБУ ФНКЦ ФХМ ФМБА России

к.б.н.



Кострюкова Елена Сергеевна