

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **Мышкиной Надежды Михайловны** «Создание автономно светящихся эукариот, экспрессирующих гены цикла кофейной кислоты», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология».

Работа посвящена метаболической инженерии клеток некоторых представителей эукариот (дрожжей, клеток млекопитающих и модельных растений) с целью воссоздания в них пути грибной биолюминесценции.

Диссертация построена по классической схеме, изложена на 139 страницах и состоит из разделов «Введение», «Обзор литературы» (стр. 15-69), «Материалы и методы» (стр. 70-81), «Результаты и обсуждение» (стр. 82-109), «Выводы», список сокращений, «Приложения» и «Список цитируемой литературы», включающий 252 ссылки, из которых 252 на английском языке и только 1 шт. на русском языке (диссертация на соискание ученой степени кандидата наук). Диссертация содержит 28 рисунков, 2 таблицы и 3 приложения.

В обзоре литературы достаточно подробно описаны подходы и способы решения задач, встающих перед исследователями в процессе направленного воздействия на метаболизм клеток хозяина. В этом разделе также содержится информация о некоторых путях биосинтеза вторичных метаболитов у растений и справедливо акцентируется внимание на трудностях прямого извлечения ценных метаболитов из растительного материала. В этой связи отмечаются преимущества переноса биосинтетических путей некоторых метаболитов в клетки гетерологичных продуцентов. Эти подходы широко используются в современной биотехнологии для производства тех или иных метаболитов, включая лекарственные препараты и т.н. биодобавки.

Получение трансгенных светящихся растений до настоящего времени оставалось несбыточной мечтой как академического, так и эстетическо-коммерческого характера как раз из-за трудностей в воспроизводстве путей биосинтеза субстратов

для люциферазы бактериального и/или животного происхождения. В случае бактериальных люцифераз основной трудностью являлось воспроизводство пути биосинтеза субстрата для люциферазы (оперон из 5 генов) и самой люциферазы (2 гена). Экспрессия такого рода генетических конструкций более подходила для хлоропластов, имеющих отчасти прокариотическую природу и соответствующий набор РНК-полимераз. Однако, нестабильность экспрессии в хлоропластах растений в сочетании в биобаллистическим методом доставки генетического материала практически обнулила все ранние попытки добиться положительного результата. Ведь не поливать же растения сверху весьма пахучим деканалом? Проблема получения светящихся растений с помощью эукариотических люцифераз (того же светлячка) сталкивалась с той же трудностью воспроизводства пути биосинтеза люциферина.

Представленная работа призвана разрешить имеющуюся методологическую коллизию за счет воссоздания в растениях грибной системы биолуминесценции на основе цикла кофейной кислоты. В связи с этим целью работы являлось изучение возможности создания автономно светящихся эукариот с помощью введения гетерологических генов, кодирующих, соответственно, грибные ферменты цикла кофейной кислоты. Для достижения данной цели были поставлены следующие задачи: 1) найти гены ферментов биосинтеза люциферина грибов; 2) подтвердить функции продуктов данных генов при гетерологической экспрессии в модельном организме; 3) подобрать вспомогательные гены, продукты которых способны катализировать превращение первичных метаболитов в предшественники люциферина грибов; 4) получить светящиеся дрожжи, растения и клетки млекопитающих, экспрессирующие гены люминесцентной системы, извлеченной из ядовитого гриба *Neonothopanus nambi* из семейства со звучным названием Marasmiaceae; 5) проанализировать интенсивность свечения различных органов и тканей растения и её изменения во времени и пространстве.

В результате работы обнаружены 3 гена, кодирующих ферменты биосинтеза люциферина грибов: гиспидинсинтазы *hisps*, гиспидин-3-гидроксилазы *h3h* и кафеоилпируватгидролазы *cph*. Показано, что в геномах люминесцирующих грибов эти гены организованы в консервативный кластер, содержащий также и ген

люциферазы грибов *luz*. Проведен функциональный анализ этих генов, кодирующих систему ферментов, необходимых и достаточных для обеспечения люминесценции. Таким образом, в работе апробирован новый биохимический путь, обозначенный авторами как “цикл кофейной кислоты”. Кроме этого в работе подобраны вспомогательные гены *tal* (тирозин-аммоний-лиаза), *c3h*, *hpaB* и *hpaC* (кумарат-3-гидроксилаза), способные катализировать превращение аминокислоты тирозина в предшественники люциферина грибов — кумаровую и кофейную кислоты, соответственно. С помощью внедрения этого метаболического пути (или даже его части) получены биолюминесцентные дрожжи *P. pastoris*, трансгенные растения *Nicotiana tabacum* и *N. benthamiana*, летки млекопитающих HEK293NT.

Замечания и комментарии:

Работа хорошо оформлена. К тексту и иллюстрациям практически нет претензий за исключением малостей, о которых даже неудобно говорить вслух.

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 изобилуют 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)?

Все высказанные в отзыве замечания и комментарии ни в коей мере не умаляют ценность представленной к защите диссертации. Прделан большой объем экспериментальной работы на разных живых объектах. В дополнение к уже сделанному и представленному в одной работе сложно ожидать каких-то исследований физиологии или биологических ритмов организмов с введенными системами свечения.

Результаты и положения диссертации опубликованы в престижных международных изданиях (PNAS, Nature Biotechnology). Представленная диссертация является научно-квалификационной работой, в которой на основании выполненных автором исследований впервые получены трансгенные клетки эукариот, в частности растений, обладающие системой постоянного свечения. Выводы из работы обоснованы, автореферат полностью отражает содержание диссертации. Таким образом, данная диссертационная работа по теоретическому уровню, объёму проведённых исследований, научной новизне и практической значимости отвечает критериям п. 9 «Положения о присуждении учёных степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 г. (с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650), а автор работы Мышкина Надежда Михайловна заслуживает присуждения ей ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - «Молекулярная биология».

Официальный оппонент:

Директор Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева (ИФР РАН) Российской академии наук, доктор биологических наук (специальность 03.01.05 - физиология и биохимия растений), профессор, член-корреспондент РАН



Д.А. Лось

25 августа 2020 г.

Лось Дмитрий Анатольевич
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук
127276 г. Москва, ул. Ботаническая 35
тел. 8-499-6785311
эл. почта: losda@ippras.ru

Подпись Лося Дмитрия Анатольевича заверяю

Ученый секретарь ИФР РАН

Печать



Н.В. Щербакова