

О Т З Ы В

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»

Диссертационная работа Мышкиной Надежды Михайловны посвящена поиску генов биосинтеза люциферина грибов и созданию на их основе автономно светящихся дрожжей, растений и клеток млекопитающих. Данная задача имеет фундаментальное и практическое значение. Установление генов, обеспечивающих биосинтез люциферина грибов, безусловно, важно с фундаментальной точки зрения, так как расширяет наши представления об метаболических процессах, вовлеченных в автономную систему свечения. Предположить функцию генов на основе исследования последовательностей ДНК светящихся грибов, а затем подтвердить ее при помощи гетерологической экспрессии – абсолютно достаточно для диссертационной работы, представляемой на соискание степени кандидата наука. Однако, в диссертации есть и вторая часть, посвященная созданию автономно светящихся растений и линии клеток человека. Данная часть работы кроме фундаментальной имеет очевидное практическое значение, так как автономное свечение может быть использовано для изучения различных процессов, происходящих в этих организмах, а в случае растений представляет эстетическую ценность.

Диссертация построена по традиционному принципу, содержит разделы: введение, обзор литературы, материалы и методы, результаты и обсуждение, заключение и выводы. Во введение диссертантом четко сформулирована научная цель и задачи исследования, обоснована научная новизна и актуальность диссертации. Стоит особенно отметить раздел обзор литературы, который очень подробно и на современном уровне описывает

современные подходы к изучению или использованию кластеров генов, отвечающих за биосинтез различных метаболитов. Для его написания было использовано более ста источников, при этом большая часть публикаций современные, данный обзор может стать основой для публикации или даже монографии, которая будет полезна ученым, планирующим эксперименты по гетерологической экспрессии генов.

Основной раздел диссертации четко и логично описывает проделанную экспериментальную работу, отвечает на поставленные во введении вопросы и демонстрирует удачное решение поставленной задачи. На первом этапе были подобраны гены кандидаты, обеспечивающие биосинтез люциферина. Затем их активность была подтверждена при помощи гетерологической экспрессии в модельном организме — дрожжах *Pichia pastoris*. Подобраны вспомогательные гены *tal*, *c3h*, *hpaB* и *hpaC*, продукты которых — тирозин-аммоний-лиаза (TAL) и кумарат-3-гидроксилаза (СЗН или гетеродимер НраВ/НраС) — способны катализировать превращение аминокислоты тирозина в предшественники люциферина грибов — кумаровую и кофейную кислоты, соответственно. Затем было создано три автономно светящихся эукариота - *Pichia pastoris*, *Nicotiana tabacum* и клетки млекопитающих НЕК293NT. Высокий технический уровень представленной диссертации можно оценить из раздела «Материалы и методы», в работе использованы самые современные биохимические, микробиологические и генетические методы. Раздел написан достаточно подробно, что помогает не только при анализе представленных результатов, но и может быть использовано в качестве методологического пособия при проведении аналогичных работ. В данном разделе отдельно представлено использованное оборудование, подобный раздел не часто встречается в диссертации, а в тоже время он крайне полезен при планировании использования представленных в работе методик.

Серьезных недостатков или противоречий в диссертации нет, поставленные задачи были решены, цель, создание автономно биолюминесцентных эукариот, достигнута. Несмотря на то, что результаты

раздела, посвященного установлению функции генов биосинтеза люциферина, не вызывает сомнений, оппоненту кажется необходимым проведение (или представление в диссертации), некоторых контрольных экспериментов. При проверке дрожжей, содержащих гены *luz*, *h3h*, *hisps* и *npga*, не хватает контроля без добавления оксилюциферина, а при тестировании автономной биолюминесценции – теста на среде без тирозина. 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. 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. В то же время, это ни в коем случае не является критическим замечанием, так как работа по масштабу и так соответствует требованиям к кандидатской диссертации.

С учетом того насколько подробно был написан обзор литературы возможно стоило подробнее обосновать выбор тех или иных генетических конструкций для экспрессии в дрожжах, растениях и клетках НЕК293NT. Например, для дрожжей был использован вектор pGAP – почему именно этот? Более важный вопрос, почему все гены вводились на отдельных плаزمидках, может стоило протестировать весь оперон целиком, в таком виде как он встречается у природных автономно биолюминесцентных грибов. Аналогичный вопрос касается и конструкции для экспрессии в клетках НЕ293NT – 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. Для повышения эффективности свечения клеток НЕК293NT можно было также попробовать интегрировать

эти гены в геном, стоит отметить, что данные возможности обсуждаются в диссертации и вероятно будут протестированы в дальнейшем.

Все перечисленные замечание и комментарии ни в коем случае не снижают очень высокий уровень представленной работы. Диссертационная работа Мышкиной Надежды Михайловны соответствует критериям п. 9 "Положения о присуждении ученых 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 сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – «молекулярная биология».

Официальный оппонент:

доктор химических наук,

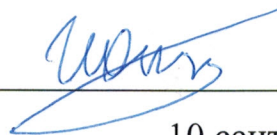
ГЛАВНЫЙ НАУЧНЫЙ СОТРУДНИК центра наук о жизни

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего

образования «Сколковский институт науки и технологий», организационно-

правовая форма: автономная некоммерческая организация.

ОСТЕРМАН Илья Андреевич



10 сентября 2020 г.

Контактные данные:

тел.: +7 495 2801481, e-mail: i.osterman@skoltech.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена

диссертация:

02.00.10 - биоорганическая химия, 03.01.03 - молекулярная биология

Адрес места работы:

121205, Москва, территория Инновационного Центра «Сколково», Большой бульвар д.30, стр.1

Автономная некоммерческая образовательная организация высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»

Тел.: +7 495 2801481, e-mail: inbox@skoltech.ru

Подпись сотрудника центра наук о жизни автономной некоммерческой образовательной организации высшего образования «Сколковский институт науки и технологий»
Остермана Ильи Андреевича удостоверяю:

РУКОВОДИТЕЛЬ ОТДЕЛА
КАДРОВОГО АДМИНИСТРИРОВАНИЯ



« 11 » сентября 2020 г.