



УТВЕРЖДАЮ:
Директор ФГБНУ ВНИИСБ,
академик РАН,
доктор биологических наук, профессор
Г.И. Карлов

_____ 2026 г

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ) на диссертацию Шаховой Екатерины Сергеевны **«Репортерная система на основе улучшенной биолюминесцентной системы грибов»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Шаховой Е.С. посвящена актуальной научной проблеме, связанной с оптимизацией автономной биолюминесцентной репортерной системы грибов с целью повышения интенсивности свечения и расширения возможностей ее использования в различных гетерологических системах. Актуальность темы не вызывает сомнений, поскольку современные репортерные системы являются базовым инструментом для анализа экспрессии генов, регистрации клеточных и физиологических процессов, разработки сенсоров и проведения неинвазивного мониторинга *in vivo* и др. В отличие от классических люциферин-зависимых систем, автономные биолюминесцентные каскады не требуют внесения субстрата извне, что делает их особенно перспективными для длительных наблюдений. Вместе с тем именно для таких систем определяющим фактором эффективности является высокая функциональность всех звеньев ферментативного пути. Повышение яркости сигнала необходимо как для регистрации слабой экспрессии и работы с минимальными количествами биологического материала, так и для расширения технических возможностей детекции, включая использование более доступного оборудования. Особую значимость исследованию придает выбор объекта: биолюминесцентная система грибов является сравнительно недавно охарактеризованной, а потому сохраняет значительный потенциал для целенаправленного редизайна и расширения перспектив ее использования в современных молекулярно-биологических исследованиях.

Научная новизна и значимость полученных результатов

Научная новизна диссертационной работы состоит в том, что в ней впервые реализован системный подход к метаболической инженерии биолюминесцентной системы грибов с целью существенного увеличения яркости автономного свечения. Важным методическим результатом стало тестирование высокопроизводительной скрининговой платформы на основе суспензионной культуры клеток ВУ-2, позволившей проводить систематическое сравнение транскрипционных единиц и эффективно использовать ее для оптимизации компонентов биолюминесцентной

системы в растительных клетках. Автором выделены и функционально подтверждены улучшенные компоненты каскада, включая ортолог гиспидинсинтазы из *Mycena citricolor*, а также улучшенные варианты гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы. На этой основе сформирована новая комбинация генов FBP3, обеспечившая прирост сигнала на 1-2 порядка в клетках растений, дрожжах и млекопитающих. Существенно, что работа не ограничивается демонстрацией локального повышения билюминесценции, а демонстрирует межсистемную проверку разработанной системы, ее сравнение с альтернативными репортерами, а также проверку при стабильной трансформации. Впервые получены автономно светящиеся линии *Arabidopsis thaliana*, *Populus canadensis* и *Petunia hybrida*. Показано, что в растительных клетках система FBP3 превосходит бактериальную автономную систему по интенсивности сигнала на два порядка, а в клетках млекопитающих достигает уровня, достаточного для регистрации на планшетном ридере. Все это позволяет рассматривать выполненную работу как значимый вклад не только в развитие фундаментальных представлений о билюминесцентных системах эукариот, но и как основу для разработки репортеров и биосенсоров нового поколения на базе улучшенной билюминесцентной системы грибов.

Оценка содержания диссертации

Диссертация Шаховой Е.С. изложена на 150 страницах и включает введение, список сокращений, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, заключение, выводы и список цитируемой литературы, содержащий 356 источника. Работа содержит 53 рисунка, 1 таблицу и 7 приложений.

Обзор литературы отличается логичной структурой и охватывает основные классы репортерных систем: колориметрические, флуоресцентные и билюминесцентные. При этом автор не ограничивается перечислением известных подходов, а проводит их содержательное сопоставление по таким параметрам, как чувствительность, особенности регистрации сигнала, зависимость от экзогенных субстратов, пригодность для экспериментов *in vivo* и потенциал для высокопроизводительного скрининга. Наиболее полно и аргументированно представлена часть, посвящённая билюминесцентным репортёрным системам. Существенным достоинством обзора литературы является рассмотрение не только фундаментальных аспектов строения и функционирования известных систем, но и возможностей их биотехнологического применения. Данный раздел логично подводит читателя к формулировке цели диссертационного исследования.

В разделе «Материалы и методы» подробно описаны методы, использованные в данной диссертации, включая конструирование плазмид для экспрессии в дрожжах, клетках млекопитающих и растениях, молекулярное клонирование, а также методы работы с различными гетерологическими системами (бактериями, дрожжами, культурами клеток млекопитающих и растений и различными растительными объектами). Кроме того, представлены методы регистрации и количественной оценки люминесцентного сигнала. Это свидетельствует о высоком уровне экспериментальной подготовки автора.

Наиболее значимой частью диссертации является глава «Результаты и их обсуждение», в которой последовательно решены все поставленные задачи. В начале работы автор тестирует высокопроизводительную скрининговую платформу на основе суспензионной культуры ВУ-2, показав ее пригодность для оценки транскрипционных единиц и оптимизации билюминесцентной системы грибов. Этот этап имеет важное значение, поскольку создает удобный и масштабируемый инструмент для отбора наиболее эффективных конструкций в

растительных клетках. Далее в диссертации проведена оптимизация ключевых компонентов системы: показана роль фосфофантетеинилтрансферазы для полноценной активации гиспидинсинтазы в растительных клетках, выполнено сравнение ортологов гиспидинсинтаз и идентифицирован наиболее эффективный вариант – гиспидинсинтаза из гриба *Mycena citricolor*, получены и охарактеризованы мутантные формы гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы - nnH3H_v2 и nnLuz_v4. Существенным достоинством работы является то, что все найденные улучшения были не просто описаны отдельно, а объединены в единую систему FBP3 и проверены в нескольких гетерологических системах. Отдельно следует подчеркнуть, что проведено сопоставление FBP3 с существующими репортерными системами в клетках млекопитающих и растений, что позволяет объективно определить реальное место разработанной системы среди альтернативных репортеров. Показано, что в растительных клетках FBP3 имеет преимущество перед автономной бактериальной системой, а также является практически значимым инструментом на фоне других биолюминесцентных репортеров. При исследовании в клетках млекопитающих автор корректно отражает как преимущества по сравнению с ранее описанной биолюминесцентной системой грибов, так и сохраняющиеся ограничения по отношению к ряду других репортёрных систем, связанные с недостаточной яркостью сигнала. Важным практическим результатом является достижение в культуре клеток млекопитающих уровня сигнала, позволяющего регистрировать свечение с помощью лабораторного планшетного ридера, что существенно повышает доступность технологии. Завершающий блок результатов, посвященный созданию и анализу трансгенных растений, придает работе особую завершенность: автором не только разработаны оптимизированные конструкции, но и получены стабильные линии нескольких видов растений с подтвержденной автономной биолюминесценцией. Такой переход от скрининговых экспериментов при временной трансформации к созданию полноценных трансгенных объектов демонстрирует высокую научную и прикладную ценность диссертации.

Основные результаты диссертации Шаховой Е.С. опубликованы в 3 статьях в международных журналах, входящих в перечень научных изданий рекомендованных Министерством науки и высшего образования Российской Федерации для опубликования результатов диссертации, а также представлены в виде устных и постерных докладов на 2 научных конференциях.

Хотя работа выполнена на высоком уровне, возникает ряд замечаний и вопросов

1. Положения 2 и 3, выносимые на защиту, в значительной степени дублируют друг друга и могли бы быть объединены в одно положение.
2. Из названия главы 3.1.2 следует, что в ней будет описана оптимизация протокола для высокопроизводительного скрининга в растительных клетках ВУ-2. Однако в данной части приводятся лишь некоторые общие характеристики без описания того, что именно было оптимизировано.
3. В части оптимизации генетических конструкций автор никак не обсуждает влияние типа UTR на экспрессию EGFP, хотя из графиков складывается впечатление, что конструкции с 5'-UTR от RBCS2B *Arabidopsis thaliana* в среднем имеют более высокий уровень экспрессии.
4. В главе 3.2.3 автор не приводит данные по общему числу проанализированных мутантов гиспидин-3-гидроксилазы nnH3H и люциферазы nnLuz, а лишь представляет варианты с наилучшей комбинацией замен.

5. Работа написана аккуратно, но встречается небольшое число опечаток (например, «люциферазаы и выбрааны» на стр. 87, «млекопитающих,, » на стр. 107).

Заключение

На основании всего вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа Шаховой Екатерины Сергеевны на тему «Репортерная система на основе улучшенной биолюминесцентной системы грибов» является законченным исследованием, выполненным на высоком научном уровне и соответствует всем критериям (в том числе п.9), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 (включая все последующие дополнения)), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Отзыв на диссертацию обсужден и одобрен на расширенном научном семинаре лаборатории маркерной и геномной селекции растений Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» «29» апреля 2026 г., протокол №3.



Киров Илья Владимирович

Доктор биологических наук,
ведущий научный сотрудник лаборатории маркерной и геномной селекции растений
Федерального государственного бюджетного научного учреждения
«Всероссийский научно-исследовательский институт
сельскохозяйственной биотехнологии»

Почтовый адрес: 127550, г. Москва, ул. Тимирязевская д. 42

Телефон: +7-(499)-976-65-44

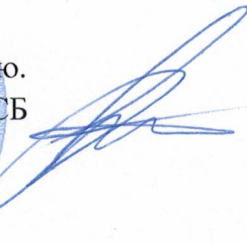
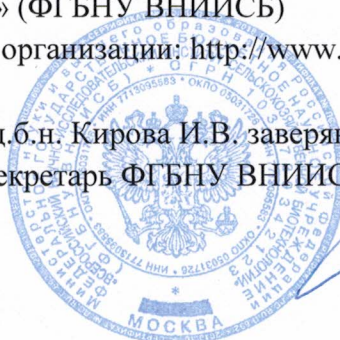
Адрес электронной почты: iab@iab.ac.ru

Организация – место работы: Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ)

Web-сайт организации: <http://www.vniisb.ru/>

Подпись д.б.н. Кирова И.В. заверяю.

Ученый секретарь ФГБНУ ВНИИСБ



к.б.н. Федина Екатерина Игоревна