

## ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертацию Екатерины Сергеевны Шаховой, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук, на тему: «Репортерная система на основе улучшенной биолюминесцентной системы грибов», по специальности 1.5.3 – «Молекулярная биология»

### Актуальность темы диссертационной работы

Большой массив данных об экспрессии генов эукариотических организмов, накопленный благодаря широкомасштабным сравнительным исследованиям, направляет усилия исследователей на изучение тонких механизмов регуляции формирования и функционирования важнейших молекулярных систем и надмолекулярных структур клеток организмов как в условиях нормальной жизнедеятельности растений, так и при воздействии стрессовых факторов среды. И, как следствие, на разработку относительно простых и одновременно эффективных подходов, позволяющих прояснить не только физиологическую роль белковых продуктов гена, но и исследовать регуляторные механизмы, обеспечивающие динамическое и устойчивое функционирование ключевых молекулярных процессов живых организмов. Эти знания создают платформу не только для уточнения функций и механизмов регуляции генов, прояснения молекулярных механизмов формирования и функционирования важнейших молекулярных систем, но и как фундамент для последующей направленной манипуляции конкретным метаболическим (сигнальным) путем. Решение этих фундаментальных задач непременно требует разработки новых экспериментальных подходов.

Так, идентификация и оценка генетических конструкций и регуляторных последовательностей, прояснение функций генных продуктов целевого гена, экспериментальная верификация локализации белкового продукта в предсказанных компартментах, изучение белок-белковых взаимодействий *in vivo* и их субклеточной локализации, и модификация систем геномного редактирования с целью увеличения эффективности его применения для прикладных целей остаются первоочередными научными задачами. И для их успешного исполнения требуются эффективные экспериментальные подходы, среди которых разработка новых репортерных систем является одним из приоритетных направлений.

Такие исследования важны как с фундаментальной точки зрения, так и с практической. Диссертационная работа Екатерины Сергеевны Шаховой посвящена рациональному редизайну репортерной системы на основе

биолюминесцентного каскада грибов для повышения яркости свечения, с последующей оценкой функциональности в различных гетерологических организмах. Принимая во внимание вышеизложенное, актуальность этой работы не вызывает сомнения.

### **Структура и содержание диссертационной работы**

Диссертационная работа, в целом, написана по традиционному плану и состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, результатов и обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы и приложений.

После краткого введения, в котором определены цель и задачи исследования, проведен анализ литературных источников, которые имеют непосредственное отношение к изучаемой проблеме. Обзор литературы охватывает основной круг вопросов, в отношении развития и применения репортерных систем как незаменимых экспериментальных инструментов для исследователей в самых разных областях науки, а именно приводится: (1) описание основных репортерных систем, включая репортерные системы, в основе которых лежит изменение цвета субстрата или его продукта в следствие функционирования репортерного белка, репортерные системы на основе флуоресцентных белков, а также репортерные системы на основе биолюминесценции; (2) современные достижения, полученные при использовании экспериментального подхода репортерных систем; (3) детальная характеристика преимуществ и ограничений используемых репортерных систем; (4) описание основных теоретических и экспериментальных подходов, которые используются в исследованиях с использованием репортерных систем.

В целом обзор литературы написан хорошим языком и касается тех проблем, которые имеют непосредственное отношение к теме диссертационной работы. Следует отметить, что все литературные данные анализируются Екатериной Сергеевной квалифицированно, а цель и задачи диссертационной работы звучат вполне убедительно.

Традиционно после обзора литературы приводится описание материалов и методов исследования. В этой главе соискателем изложены основные методические особенности и приемы работы. Использован целый арсенал классических и современных методов, применяемых в мировой практике молекулярных исследований, в частности, молекулярного клонирования, методов анализа экспрессии генов, методы статистической обработки экспериментальных

данных. Следует отметить вполне удовлетворительную разрешающую способность избранных для работы методов и в ряде случаев их успешную модификацию с учетом специфики проводимых исследований.

Аналитическое рассмотрение Главы "Результаты и обсуждение" позволяет заключить следующее: соискателем была проведена серия теоретических и экспериментальных исследований, в целом, спланированных на хорошем профессиональном уровне, которые позволили решить поставленные в ходе работы задачи. Эта часть диссертационной работы включает два основных раздела, которые представлены подразделами.

В первой части диссертационной работы Екатерина Сергеевна апробирует суспензионную культуру клеток *N. tabacum* BY-2 с целью разработать на ее основе протокол для высокопроизводительной скрининговой платформы и использовать ее для оценки функциональности разных транскрипционных единиц. Следует отметить, что предположение диссертанта базируется на свойствах растительной культуры, которая характеризуется быстрым ростом, однородностью клеточной популяции и достаточно простыми методами культивирования. Проведенные экспериментальные исследования позволили соискателю адаптировать протокол, позволяющий проводить скрининг с использованием клеток BY-2 в формате 96-луночных планшетов.

Дальнейшие усилия диссертанта направлены на оценку эффективности предлагаемой системы на основе растительных клеток BY-2 за счет сравнительного анализа активности разных промоторов при транзientной экспрессии с использованием флуоресцентного белка, а также потенциальной роли влияния оптической плотности суспензии агробактерий на уровень транзientной экспрессии в клетках растений. В ходе проведенных исследований, соискателю удалось убедительно доказать широкий диапазон уровней экспрессии, охватывающий два порядка величины, и получить данные для большого диапазона эффективных "доз" генов, выявив как линейные, так и нелинейные зависимости экспрессии при сравнении промоторов.

Поскольку диссертант выяснила, что модельная система, основанная на растительных клетках BY-2 в формате 96-луночных планшетов эффективна, это послужило отправной точкой для дальнейшего сравнительного анализа. А именно, сравнительного анализа 19 промоторов разного происхождения (вирусные, синтетические и нативные промоторы растений) с использованием гена-репортера EGFP в двух экспрессионных системах *Nicotiana* spp. - на основе

растительных клеток табака BY-2 и листьев *N. benthamiana*. Полученный массив данных позволил соискателю рассчитать корреляцию между двумя использованными моделями для временной экспрессии гетерологичных генов, используя для оценки коэффициент ранговой корреляции Спирмена. На основе совокупности экспериментальных данных Екатериной Сергеевной сделано обоснованное заключение о том, что суспензионная культура BY-2 является эффективной альтернативой традиционному тестированию методом агроинфильтрации листьев *N. benthamiana*, обеспечивая более высокопроизводительный скрининг, требующий меньших временных и материальных затрат. В пользу этого заключения выступают и данные, что разбросы значений в случае использования скрининговой системы на основе клеток BY-2 гораздо меньше по сравнению с экспрессией в листьях *N. benthamiana*, то есть такая система позволяет получать более точные данные.

Поскольку диссертационная работа Екатерины Сергеевны посвящена рациональному редизайну репортерной системы на основе биолюминесцентного каскада грибов, вполне логичным видится тестирование возможности суспензионной культуры BY-2 как скрининговой системы для последующей оценки эффективности оптимизации биолюминесцентной системы грибов. Для этого соискатель использовала экспрессионный вектор, несущий необходимые для биолюминесцентного свечения в растениях компоненты. Проведенные эксперименты и полученные результаты оправдали надежды соискателя. Оказалось, что при титровании клеточной плотности агробактерий фиксируется линейный отклик сигнала, что говорит в пользу эффективности клеточной культуры BY-2 в качестве скрининговой платформы при разработке более ярких биолюминесцентных систем.

Вторая часть диссертационной работы связана с оптимизацией репортерной системы на основе биолюминесценции грибов. Прежде всего, хотелось подчеркнуть, что проведенные соискателем исследования базируются как на результатах, полученных в лаборатории ранее, так и на знании метаболического пути формирования биолюминесцентной системы грибов. А именно на том, что для эффективного функционирования этой системы требуется последовательные метаболические преобразования: от кофейной кислоты до светящегося метаболита оксильюциферина, которые опосредуются тремя ключевыми ферментами - гиспидинсинтаза, гиспидин-3-гидроксилаза и люцифераза. И дополнительно следует учитывать функционирование

каффеоилпируватгидролазы, которая участвует в возвращении оксильюциферина обратно в цикл путем его гидролиза до кофейной кислоты и пирувата. При этом активность некоторых ферментов может зависеть от возможности эффективных посттрансляционных модификаций, и, в частности, при их синтезе в гетерологичных организмах.

В связи с этим, соискатель выбирает стратегию исследования, основанную на модификацию ключевых компонентах биолюминесцентной системы грибов, поиска и апробации сочетаний улучшенных компонентов системы, и оценки эффективности системы при дополнении фосфопантетеинилтрансферазой и кафеоилпируватгидролазой для улучшения эффективности ее применимости в культуре клеток растений, млекопитающих и дрожжей.

Для этого, Екатерина Сергеевна первоначально проводит исследования, направленные на поиск оптимального фермента для гетерологической экспрессии гиспидинсинтазы, как ключевого фермента системы, из других видов грибов, в геноме которых есть гены биолюминесцентной системы. Сравнительная оценка эффективности гиспидинсинтаз из 10 видов грибов, позволила выбрать гиспидинсинтазу из *Mycena citricolor*, которая оказалась более активной, показав увеличение яркости во всех использованных организмах в 1,8 - 3,2 раза. Это оправдано в силу того, что мутагенез гена затруднен в связи с большим размером кодирующей последовательности гена.

Для увеличения эффективности работы двух других ключевых компонентов биолюминесцентной системы гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы соискатель применила методы консенсусного мутагенеза, в результате которого были внесены замены в аминокислотные последовательности ферментов. И дальнейший сравнительный анализ эффективности их функционирования в различных гетерологических системах (клетках млекопитающих, дрожжах) позволил выбрать мутантные формы улучшенных вариантов гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы для дальнейшей работы.

Результаты этих исследований позволили диссертанту определить улучшенные компоненты биолюминесцентной системы грибов: гиспидинсинтаза *mcitHispS* из *Mycena citricolor*, улучшенные варианты ферментов из *Neonothopanus nambi* – гиспидин-3-гидроксилаза *nnH3H\_v2* и люцифераза *nnLuz\_v4*, с использованием комбинации направленного и случайного мутагенеза, а также скрининга ортологов.

Дальнейшие усилия соискателя были направлены на проверку сочетаний улучшенных компонентов FBP в разных гетерологических системах за счет поэтапной замены генов системы FBP1 (nnHispS, nnH3H\_wt, nnLuz\_wt) на гены с более высокой функциональностью, начиная с лимитирующей реакции – биосинтеза гиспидина. Первоначально, соискатель проводит оптимизацию кодового состава ключевых компонентов системы для обеспечения оптимальной экспрессии интересующих генов в разных гетерологических хозяевах.

Серия проведенных экспериментов позволили соискателю получить приоритетные данные, которые убедительно показали, что (1) в клетках дрожжей *P. pastoris* наиболее яркой по свечению оказалась FBP3 система, сочетающая в себе все улучшенные этапы биосинтеза и окисления люциферина грибов, при этом отмечено, что наибольший вклад в увеличение свечения внесла мутантная форма гиспидин-3-гидроксилазы nnH3H\_v2; (2) сочетание улучшенных компонентов FBP в клетках млекопитающих показало, что сочетание генов FBP3 приводит к значительному увеличению биолюминесцентного сигнала по сравнению с прошлой версией FBP1, а наибольшую роль в улучшении системы сыграла мутантная форма люциферазы nnLuz\_v4, отмечая, что увеличение яркости системы FBP3 позволяет отказаться от специализированного оборудования и перейти к более доступному методу детекции с использованием планшетного ридера, что значительно расширяет потенциальные области применения усовершенствованной биолюминесцентной системы. В то же время по сравнению с другими репортерами уровень свечения FBP3 был ниже, и свидетельствует о необходимости дальнейшей оптимизации системы FBP3 для применения в качестве репортерной системы в культуре клеток млекопитающих. А также (3) произвели комбинаторное сравнение разных сочетаний генов FBP при транзientной трансформации растительных клетках BY-2 и выявили, что наиболее яркое свечение достигается путем сочетания генов *NpgA*, *mcitHispS*, *nnH3H\_v2*, *nnLuz\_wt/v4*, *nnCPH*.

Несмотря на то, что основная цель диссертационной работы – рациональный редизайн репортерной системы на основе биолюминесцентного каскада грибов для повышения яркости свечения, с последующей оценкой функциональности в различных гетерологических организмах – практически достигнута, соискатель ставит перед собой еще одну важную задачу. Это задача –

оценить возможность использования биолюминесцентной системы для получения трансгенных растений.

Для реализации этой задачи первоначально соискатель проводит оптимизацию транскрипционных единиц FBP для вектора, используемого для стабильной трансформации растений. В результате разработана эффективная схема сборки длинных генетических конструкций через модульное клонирование и проведен дизайн векторов для стабильной трансформации растений с оптимизацией транскрипционных единиц, а именно с новым сочетанием промоторов и терминаторов для генов FBP систем, а также с альтернативным порядком генов внутри T-ДНК. Последующая сравнительная оценка полученных векторных конструкций - с исходным порядком генов (вектора FBP2\* и FBP3\*), так и с альтернативным расположением генов внутри T-ДНК (вектора FBP2 и FBP3) - методом транзientной экспрессии продемонстрировала преимущество конструкций с альтернативным порядком генов в составе T-ДНК. А последующее сравнение FBP3 с альтернативными биолюминесцентными репортерными системами при транзientной экспрессии в клетках растений убедительно продемонстрировало, что биолюминесцентный сигнал FBP3 системы сопоставим по интегральному сигналу с сигналом от люциферазы NanoLuc, на порядок превышает сигнал от люциферазы FLuc.

Серия экспериментов по созданию и последующему анализу трансгенных растений *N. benthamiana*, *N. tabacum*, *A. thaliana*, тополя (*P. canadensis*) и петунии (*Petunia hybrida*), стабильно экспрессирующих гены FBP, выявили следующие закономерности: (1) для трансгенных линий *N. benthamiana* яркость люминесценции увеличивается в ряду FBP1, FBP2, FBP3 более, чем на порядок величины; (2) для растений *N. tabacum*, яркость трансгенных линий, стабильно экспрессирующих гены FBP2 системы, превышала более чем на порядок яркость ранее полученных линий табака с FBP1 системой; (3) для трансгенных линий *A. thaliana* наибольшим люминесцентным сигналом характеризовались трансгенные растения, экспрессирующие кассеты с FBP3 системой; (4) у трансгенных линий растений тополя *P. canadensis*, линии, экспрессирующие гены FBP2 системы, демонстрировали более яркий сигнал, чем трансгенные растения, экспрессирующие гена FBP1 системы; (5) в трансгенных линиях петунии *P. hybrida* функционировала как FBP2, так и FBP3 система.

В разделе «Заключение», Екатерина Сергеевна кратко суммирует полученные результаты. Сделанные диссертантом выводы полностью отражают

результаты работы и новизну, научную и практическую значимость полученных результатов. Диссертационная работа соискателя, в целом, написана хорошим профессиональным языком, все экспериментальные данные сведены в таблицы и рисунки.

#### **Степень новизны результатов научных исследований.**

Проведенные теоретические и экспериментальные исследования позволили диссертанту впервые разработать улучшенную биолюминесцентную систему грибов, включающую гиспидинсинтазу из *Mycena citricolor*, улучшенные варианты ферментов гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы из *Neonothopanus nambi*, которые в сочетании с фосфопантетеинилтрансферазой и кафеоилпируватгидролазой обеспечивают увеличение биолюминесцентного сигнала по сравнению с ранее описанными ферментами в различных гетерологичных системах экспрессии – растения, клетки дрожжей и млекопитающих.

#### **Научная и практическая значимость результатов**

Диссертационная работа Екатерины Сергеевны Шаховой совмещает в себе и фундаментальность, и практическую значимость. Полученные соискателем результаты важны для развития фундаментальных представлений о тонких молекулярных механизмах регуляции экспрессии генов, за счет конструирования на основе улучшенной биолюминесцентной системы разнообразные биосенсоры для мониторинга физиологических процессов как в растениях, так и в клетках млекопитающих.

С практической точки данная работа интересна тем, что разработанный протокол высокопроизводительного формата агробактериального заражения полусухих агрегатов культуры растительных клеток, а также генно-инженерные конструкции, полученные в данной работе, могут быть использованы для систематического сравнения транскрипционных единиц с использованием биолюминесцентных и флуоресцентных репортерных систем.

#### **Обоснованность заключительных выводов и рекомендации**

Использование для исследований классических и современных биоинформатических, молекулярно-биологических и генетических методов, а также методов анализа экспериментального материала подтверждают обоснованность и достоверность экспериментальных результатов,

представленных в диссертационной работе Екатерины Сергеевны, а также выносимых на защиту положений и выводов.

### **Полнота опубликованности положений и результатов диссертации**

Основные положения и результаты исследований по диссертации Екатерины Сергеевны Шаховой опубликованы в 3 статьях в зарубежных научных журналах из списка изданий, рекомендованных Минобрнауки России. Рукопись автореферата соответствует содержанию рассматриваемой диссертации, результатам и положениям, выносимым на защиту.

### **Вопросы, замечания и комментарии к диссертационной работе**

При аналитическом рассмотрении представленных в диссертационной работе материалов возникло ряд вопросов:

1. - В разделе «Обзор литературы», было бы уместным суммировать в таблице репортерные системы, которые рассматривает соискатель, с указанием их преимуществ и ограничений (согласно основным требованиям к репортерным системам - наличие простых чувствительных качественных и количественных методов тестирования активности; отсутствие фоновой активности, отсутствие значительного влияния на метаболизм хозяина, возможность достроек в с- и п-концевой области белка, оставаясь при этом активными, *in situ* и/или *in vivo* системы оценки; стабильность в клетках гетерологичного хозяина, необходимость применения дорогостоящего оборудования или реагентов), а также общее заключения по современному состоянию проблемы, с указанием тех пунктов, которые представляют интерес для соискателя.
2. На основе каких соображений или данных выбраны для мутагенеза определенные аминокислотные остатки в последовательностях гиспидин-3-гидроксилазы и люциферазы?
3. Соискатель указывает, что провели оптимизацию кодирующей последовательности генов FBP для экспрессии в разных гетерологичных системах. Тем не менее четко не указано в дальнейших работах использованы только гены с оптимизированным кодоновым составом? И показано ли что оптимизация кодонового состава в значительной мере обеспечила увеличение эффективности работы биолюминесцентной системы? Все гены, обозначенные в Приложении 1 – это гены с

измененным кодоновым составом? И все дальнейшие исследования проводили с генами, имеющие оптимизированный кодоновый состав?

4. Было бы правильно более четко дать описание отличий между системами FBP1 и FBP3 – какие модификации в генах системы - *mcitHispS*, *nnH3H\_v2* и *nnLuz\_v4* были проведены по сравнению с *nnHispS*, *nnH3H\_WT* и *nnLuz\_WT*. Например в таблице четко описать различия в компонентах систем.
5. Применялось ли сочетание фосфопантетеинилтрансферазой *prgA* и кафеоилпируватгидролазой *nnCPH* в культуре клеток млекопитающих и дрожжей. Так, в Приложении 1 организм, для экспрессии в котором была оптимизирована кодирующая последовательность: ген *CPH* не указан для клеток дрожжей. Помимо этого, для некоторых генов указано общая последовательность – например, *NrgA*, *CPH*, либо объединенно для клеток дрожжей и млекопитающих.
6. Нет данных, подтверждающих, что полученные трансгенные линии растений являются гомозиготными линиями.

Это осталось в работе без пояснения или обсуждения.

По разделам диссертационной работе Екатерины Сергеевны имеется ряд замечаний и пожеланий, которые могут быть учтены в дальнейших работах соискателя.

Ко всем разделам диссертационной работы:

- в отношении написания генов прокариот – их следует обозначать только строчными буквами (например, *uidA*, *lacZ*); и эндонуклеаз рестрикции – они отмечаются курсивом; в отношении написания эндонуклеаз рестрикции – они отмечаются курсивом – например, *Bsal*, *Bpil*;
- раздел «Материалы и методы» содержит слишком много детализированной информации, которая взята из известных изданий, есть повторы, тогда как некоторые важные, на наш взгляд, моменты упущены. Например, нет описания протоколов получения трансгенных растений табака (*N. tabacum*), петунии и тополя или ссылки на примененные протоколы; в работе не указано как проведен отбор первичных трансформантов растений, оценено ли количество копий Т-ДНК в геноме трансгенных линий, целостность вставки Т-ДНК, не указан штамм агробактерий, используемый для получения трансгенных растений.

- в тексте имеются некоторые стилистические погрешности неточности и неудачные выражения, и не профессиональное использование некоторых терминов и обозначений. Например, более профессионально было бы использовать обозначения: «промотор 35S РНК CaMV» вместо «35S промотор»; «С-концевая область белка» вместо «С-конец»; «Метод электропорации для трансформации клеток» вместо «Электрическая трансформация клеток бактерий или клеток дрожжей»; «репортерные системы» вместо «репортёрные системы», поскольку в данном случае этот термин предложен в 1995 году исследователями из Бостона.
- В подразделе «Оптимизация кодирующей последовательности генов FBP для экспрессии в разных гетерологических хозяевах» дается ссылка на Приложение 1, в котором нет информации по оптимизации кодирующих последовательностей, а приводятся плазмиды, кодирующие гены биолюминесцентной системы грибов (ID плазмиды, карта генетической конструкции).
- насколько справедливо использовать термин «высокая гомология»? Следует отметить, что термин «высокая степень гомологии» использовать не корректно, тем более обозначать ее в процентах. Белки либо гомологи, либо не гомологи, а гомология оценивается такими показателями, как идентичность (Identity) или подобие (Similarity), выраженными в процентах и чаще всего в процентах указывается идентичность, показатель, который является результатом анализа аминокислотных последовательностей с использованием сервера Blast.

Все замечания к работе исчерпываются выше названными, большинство из которых, видимо, следует отнести к разряду досадных неточностей в оформлении работы. Высказанные замечания не носят принципиального характера, не затрагивают сути научных выводов, сделанных диссертантом, и не умаляют значения представленной работы, выполненной, в целом, на высоком научном и методическом уровне, и оставляющей, в целом, хорошее впечатление. Следует еще раз отметить правильность выбранной стратегии исследования и высокую квалификацию исполнения, что положительно характеризует самого исследователя, а также, безусловно, свидетельствует о высоком уровне исследований научного подразделения, в котором выполнялась данная работа.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Диссертационная работа Шаховой Екатерины Сергеевны на тему «Репортерная система на основе улучшенной биолюминесцентной системы грибов» по актуальности, новизне, теоретической и практической значимости соответствует критериям (в том числе п. 9-14), установленным "Положением о присуждении ученых степеней" (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 в современной редакции со всеми изменениями и дополнениями), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - Молекулярная биология.

Официальный оппонент:  
 Доктор биологических наук,  
 Руководитель лаборатории функциональной геномики  
 Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
 Институт физиологии растений им К.А. Тимирязева  
 Российской академии наук,



Голденкова-Павлова Ирина Васильевна

«14» мая 2026 года

Контактные данные:

тел. +7 (499) 678-53-56; E-mail: [irengold58@gmail.com](mailto:irengold58@gmail.com)

Адрес места работы:

127276 Российская Федерация, г. Москва, ул. Ботаническая, дом 35, Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук, группа функциональной геномики

Подпись сотрудника Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук Ирины Васильевны Голденковой-Павловой удостоверяю:

Ученый секретарь  
 Федерального государственного бюджетного учреждения науки  
 Института физиологии растений им К.А. Тимирязева  
 Российской академии наук, к.б.н.



Николай Васильевич Лобус

«14» мая 2026 года

Я, Голденкова-Павлова Ирина Васильевна, даю согласие на включение своих персональных данных в документы, связанные с защитой диссертации Шаховой Екатерины Сергеевны, и их дальнейшую обработку.

«14» мая 2026 года  Ирина Васильевна Голденкова-Павлова