

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.037.01,**

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

решение диссертационного совета от 10 июня 2026 № 12

О присуждении **Шаховой Екатерине Сергеевне**, гражданке Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Репортерная система на основе улучшенной биолюминесцентной системы грибов» по специальности 1.5.3 – молекулярная биология принята к защите 11 марта 2026 г., (протокол заседания №6) диссертационным советом 24.1.037.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Государственного научного центра Российской Федерации Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ГНЦ ИБХ РАН), (117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15 февраля 2013 года, а также Приказа Минобрнауки России № 561 от 03.06.2021 г.

Соискатель Шахова Екатерина Сергеевна, "31" июля 1996 года рождения, в 2020 году окончила кафедру биоорганической химии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова» по направлению подготовки 06.04.01 Биология, наименование программы: “биоорганическая химия”.

В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории химии метаболических путей ГНЦ ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории химии метаболических путей ГНЦ ИБХ РАН.

Научный руководитель – кандидат биологических наук Мишин Александр Сергеевич, заведующий лабораторией оптического биоимиджинга Отдела биомолекулярной химии ГНЦ ИБХ РАН.

**Официальные оппоненты:**

**Муронец Владимир Израилевич** – доктор биологических наук, профессор, заведующий отделом биохимии животной клетки НИИ Физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет им. М.В.Ломоносова»,

**Голденкова-Павлова Ирина Васильевна** – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник, заведующая лабораторией функциональной геномики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН)

дали *положительные* отзывы на диссертацию.

**Ведущая организация** Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Всероссийский научно-исследовательский институт сельскохозяйственной биотехнологии» (ФГБНУ ВНИИСБ), г. Москва, в своем *положительном* заключении, подписанном заведующим лабораторией маркерной и геномной селекции растений, д.б.н. Кировым Ильей Владимировичем, утверждённом директором Института, д.б.н., профессором, академиком РАН Карловым Геннадием Ильичом, указала, что диссертационная работа Шаховой Екатерины Сергеевны на тему «Репортерная система на основе улучшенной билюминесцентной системы грибов» 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 со всеми изменениями Постановлений Правительства РФ), а сам диссертант несомненно заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология."

Соискатель имеет **11** опубликованных работ, в том числе по теме диссертации 3 работы общим объёмом 5,25 печ.л. опубликованные в рецензируемых научных журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки России для опубликования результатов диссертаций. В диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые Е.С. Шахова внесла основной вклад:

**Shakhova E.S.**, Markina N.M., Mitiouchkina T., Bugaeva E.N., Karataeva T.A., Palkina K.A., Fakhranurova L.I., Yampolsky I.V., Sarkisyan K.S., Mishin A.S. Systematic Comparison of Plant Promoters in *Nicotiana spp.* Expression Systems //International journal of molecular sciences. – 2022. – Т. 23. – №. 23. – С. 15441. doi: 10.3390/ijms232315441

**Shakhova E.S.\***, Karataeva T.A.\*, Markina N.M.\*, Mitiouchkina T.\*, Palkina K.A.\*, Perfilov M.M\*., Wood M.G., Hoang T.T., Hall M.P., Fakhranurova L.I., Alekberova A.E., Malyshevskaja A.K.,

Gorbachev D.A., Bugaeva E.N., Pletneva L.K., Babenko V.V., Boldyreva D.I., Gorokhovatsky A.Y., Balakireva A.V., Gao F., Choob V.V., Encell L.P., Wood K.V., Yampolsky I.V., Sarkisyan K.S., Mishin A.S. An improved pathway for autonomous bioluminescence imaging in eukaryotes //Nature Methods. – 2024. – Т. 21. – С. 406-410. doi: 10.1038/s41592-023-02152-y (\* равный вклад авторов)

Stevani C.V., Zamuner C.K., Bastos E.L., de Nóbrega B.B., Soares D.M.M., Oliveira A.G., Bechara E.J.H., **Shakhova E.S.**, Sarkisyan K.S., Yampolsky I.V., Kaskova Z.M. The living light from fungi //Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochemistry Reviews. – 2024. – Т. 58. – С. 100654. doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2024.100654

На диссертацию и автореферат поступили отзывы:

**1. Отзыв официального оппонента д.б.н., проф. Муронца Владимира Израилевича.**

Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

Цитата: “По диссертационной работе есть несколько вопросов и небольшие замечания. Первая фраза во введении не совсем точно дает определение билюминесценции. Стр. 38 – бета-меркаптоэтанол может оказывать как негативное, так и положительное воздействие на ферменты в зависимости от его концентрации. Ссылки на работы в российских изданиях принято давать до англоязычных, причем если статья переведена на английский, то лучше давать ссылку на русский вариант (например, на статьи в журнале «Биохимия»). Непонятно что за ссылка под номером 351. Мне кажется, что лучше использовать латинские сокращения, рекомендованные редакцией журнала «Биохимия». У диссертанта три варианта: русский (АТФ), латинский (АМР) и самый странный - смешанный (НАДН).

На рис. 27 приведены данные, по которым рассчитывали  $K_m$  и  $V_m$  для мутантной люциферазы и фермента дикого типа. Хотя в целом выводы о свойствах двух форм фермента верны, однако значения  $K_m$  определены неверно, так как они практически совпадают с концентрацией субстрата в последней экспериментальной точке. Сравнение эффектов при использовании систем FBP1, FBP2 и FBP3 (рис. 42 -44) следовало бы делать более точно и конкретно. Так, превосходство FBP3 выражено только в опытах, приведенных на рис. 42, на рис. 43 данных по этой системе нет, а на рис. 44 результаты с FBP2 и FBP3 одинаковы. О преимуществах систем FBP2 и FBP3 в опытах на петуниях судить сложно из-за отсутствия данных о системе FBP1.”

**2. Отзыв официального оппонента д.б.н., Голденковой-Павловой Ирины Васильевны.**

Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

Цитата: “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*, *nnH3N\_v2* и *nnLuz\_v4* были проведены по сравнению с *nnHispS*, *nnH3N\_WT* и *nnLuz\_WT*. Например в таблице четко описать различия в компонентах систем.

5. Применялось ли сочетание фосфопантетеинилтрансферазой *npgA* 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, *NpgA*, *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, *BsaI*, *BpiI*;

- 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.”

**3. Отзыв ведущей организации.** Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

Цитата: “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 выбранаы» на стр. 87, «млекопитающих,, » на стр. 107).”

**4. Отзыв на автореферат от к.х.н., заведующей лабораторией молекулярной онкологии Федерального государственного бюджетного учреждения «Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины имени академика Ю.М. Лопухина Федерального медико-биологического агентства» (ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. Ю.М. Лопухина ФМБА) Шендер Виктории Олеговны.** Отзыв положительный, замечаний не содержит. У автора отзыва имеется несколько вопросов:

Цитата: “1) Чем могут объясняться различия эффективности системы FBP3 в растительных клетках и клетках млекопитающих?

2) Проводилась ли оценка возможной токсичности экспрессии системы FBP3 для растений? Оказывает ли экспрессия данной системы влияние на рост, развитие и физиологическое состояние растений при длительном культивировании?”

**5. Отзыв на автореферат от к.б.н. старшего научного сотрудника лаборатории эпигенетики Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института общей генетики им. Н.И. Вавилова Российской академии наук Коробко Елены Владимировны.** Отзыв положительный. Замечаний не содержит.

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их научными достижениями в близких областях к теме диссертационной работы, а именно: исследования гетерологической экспрессии генов в разных клеточных культурах в том числе клетках растений и млекопитающих, исследования физиологии растений, а также работы с природными соединениями, которые подтверждены публикациями в ведущих научных российских и международных журналах. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской и экспертной работы оппонентов и представителей ведущей организации

позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что в результате выполненных соискателем исследований были выявлены ключевые компоненты биolumинесцентной системы грибов, обеспечивающие увеличение сигнала: ортолог гиспидинсинтазы *mcitHispS* из *Mycena citricolor*, а также мутантные варианты ферментов *nnH3H\_v2* и *nnLuz\_v4*. На основе указанных компонентов создана улучшенная система FBP3, которая в клетках растений, дрожжей и культуре клеток млекопитающих обеспечивает увеличение интенсивности свечения на 1-2 порядка по сравнению с ранее опубликованной системой. На основе улучшенной биolumинесцентной системы грибов были получены автономно светящиеся трансгенные растения *Nicotiana tabacum* и *N. benthamiana*, интенсивность свечения которых на порядок превышала таковую у ранее полученных растений. Кроме того, впервые были созданы автономно светящиеся растения *Arabidopsis thaliana*, *Populus canadensis* и *Petunia hybrida*. Кроме того, для систематического сравнения транскрипционных единиц в растительных клетках впервые был использован высокопроизводительный подход, основанный на агробактериальном заражении полусухих агрегатов культуры клеток ВУ-2, для которого показана хорошая корреляция с традиционным методом агроинfiltrации листьев.

Теоретическая значимость исследования состоит в расширении знаний о механизме функционирования ферментов биolumинесцентной системы грибов. На уровне индивидуальных ферментов установлены улучшающие аминокислотные замены, проясняющие связь структуры и функции этих белков. На уровне объединения в мультиферментный каскад различных вариантов улучшенных белков и белков дикого типа, а также оценки функционирования биосинтетического каскада в различных гетерологических системах экспрессии, получены данные, проясняющие лимитирующие стадии биосинтеза люциферина грибов.

Практическая значимость работы определяется созданием репортерной системы на основе улучшенной биolumинесцентной системы грибов, применимой в разных гетерологических организмах. Разработанная система FBP3 обеспечивает существенное повышение яркости свечения по сравнению с ранее описанной системой, что расширяет возможности ее использования для неинвазивного мониторинга экспрессии генов и физиологических процессов. Продемонстрированная возможность регистрации сигнала на планшетном ридере в культуре клеток млекопитающих, а также получение стабильных автономно светящихся трансгенных растений разных видов свидетельствуют о высоком потенциале разработанной системы как основы для создания новых репортеров и биосенсоров, востребованных в молекулярной биологии, биотехнологии и синтетической биологии.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные данные получены современными методами, с использованием сертифицированного оборудования, показана воспроизводимость результатов в различных условиях. Данные получены в нескольких биологических и технических репликах в независимых экспериментах.

Личный вклад Шаховой Е.С. заключается в планировании, подготовке и проведении экспериментов, анализе полученных результатов и подготовке публикаций. Основные результаты работы были получены соискателем лично, за исключением эксперимента по сравнению гиспидинсинтаз в растительных клетках (проведены совместно с К.А. Палкиной, лаборатория химии метаболических путей, ГНЦ ИБХ РАН), эксперимента по сравнению гиспидинсинтаз в культуре клеток млекопитающих (проведены совместно с Н.М. Мышкиной и А.Е. Алекберовой, лаборатория химии метаболических путей, ГНЦ ИБХ РАН), получению мутантных форм ферментов гиспидин-3-гидроксилазы (nnH3H\_v2) и люциферазы (nnLuz\_v4) (проведены совместно с компаниями Promega и Планта), эксперимента по определению константы Михаэлиса для люцифераз грибов nnLuz\_wt и nnLuz\_v4 в лизатах дрожжей (проведены совместно с К.А. Палкиной, лаборатория химии метаболических путей, ГНЦ ИБХ РАН), создания стабильных линий растений различных видов (проведены совместно с Т.Ю. Митюшкиной, Т.А. Каратаевой, лаборатория молекулярных основ стрессоустойчивости растений, ФИБХ РАН).

На основании вышеизложенного диссертационный совет заключает, что диссертация Шаховой Е.С. является законченной научно-квалификационной работой, результаты которой имеют важное значение для развития молекулярной биологии и биотехнологии, в частности расширяют современные представления об автономной биолюминесцентной системе грибов, а созданная на ее основе улучшенная репортерная система формирует основу для дальнейшей разработки эффективных репортеров и биосенсоров. Таким образом, диссертационная работа Шаховой Екатерины Сергеевны «Репортерная система на основе улучшенной биолюминесцентной системы грибов», представленная на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 - молекулярная биология, соответствует всем требованиям (в том числе п.9), предъявляемым к кандидатским диссертациям «Положением о присуждении ученых степеней» (утверждено положением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842 со всеми изменениями Постановлений Правительства РФ).

В ходе защиты были заданы следующие вопросы:

1. Почему разница по свечению между системами FBP1 и FBP3 в клетках дрожжей 11 раз, а в клетках млекопитающих составила 64.5 раза?

2. Проводилось ли сравнение систем FBP в клетках млекопитающих при более низких температурах?

3. Есть сведения из прессы, что в Китае ведутся разработки биолюминесцентных растений хозяйственного назначения. Есть ли в открытом доступе информация, какая биолюминесцентная система там используется?

4. Как биолюминесценция влияет на физиологическое состояние и устойчивость растений к болезням?

5. Изучалась ли взаимосвязь структуры и активности компонентов биолюминесцентной системы?

6. Вы в своей работе применили рациональный дизайн, сразу сравнивая несколько параметров, уже протестировано много вариантов, это точка приложения машинного обучения, можете прокомментировать?

Соискатель Шахова Е.С. ответила на заданные ей в ходе заседания вопросы и привела собственную аргументацию:

1. Использование мутантной формы люциферазы nnLuz\_v4 приводит к наибольшему увеличению сигнала среди всех улучшенных компонентов биолюминесцентной системы грибов в клетках млекопитающих – в 32 раза. Кроме того, для данного мутанта была показана повышенная стабильность в клетках дрожжей при более высоких температурах, что может быть особенно важно при экспрессии в клетках млекопитающих, поскольку эксперименты проводятся при 37°C. Поэтому можно предположить, что использование nnLuz\_v4 в клетках млекопитающих вносит большой вклад в увеличение сигнала и, как следствие, приводит к более выраженным различиям между системами FBP1 и FBP3 по сравнению с клетками дрожжей.

2. Такие эксперименты не проводились.

3. Есть недавно опубликованные статьи по получению биолюминесцентных табаков и тополей с использованием биолюминесцентной системы грибов.

4. При сравнении с растениями дикого типа фенотипических различий не выявлено. Исследования влияния биолюминесценции на устойчивость к болезням не проводились.

5. На молекулярном уровне такие исследования не проводились. Были получены аминокислотные замены в nnH3N и nnLuz, и в дальнейшем можно будет проанализировать их положение в структуре белков и понять, как именно они влияют на активность ферментов.

6. Отсутствие экспериментально определённых структур ферментов затрудняет применение такого подхода. Однако современные методы предсказания структуры белков позволяют получать структурные модели и открывают возможности для дальнейшего редизайна ферментов.

