

Министерство науки и высшего
образования
Российской Федерации
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ
БЮДЖЕТНОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ

ИНСТИТУТ
ФИЗИОЛОГИИ РАСТЕНИЙ
им. К.А. Тимирязева
Российской академии наук

127276, г. Москва, ул. Ботаническая, д.35
Тел.: (499) 678-54-00 Факс: (499) 678-54-20
E-mail: office@ifr.moscow; ifr@ippras.ru

03.04.2025 № 244/25

На № _____ от _____



УТВЕРЖДАЮ

Директор ИФР РАН

Лось Д.А.

2025 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева Российской академии наук (ИФР РАН) на диссертационную работу **ПАЛКИНОЙ Ксении Андреевны «Ферменты биосинтеза поликетиды гиспидина из кофейной кислоты»**, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.3 – молекулярная биология.

Актуальность работы. Диссертация ПАЛКИНОЙ К.А. посвящена изучению ферментов поликетидсинтаз, которые способны производить гиспидин и поддерживать биолюминесценцию живых систем. Гиспидин – поликетид, встречающийся в природе как метаболит грибов и растений различных родов и семейств. В последнее время особое внимание к этому поликетиду привлек расшифрованный каскад биолюминесценции грибов на примере *Neonothopanus nambi*, в котором гиспидин был описан как предшественник люциферина грибов – 3-гидроксигиспидина.

Следует отметить, что гиспидин был описан и для организмов, не обладающих биолюминесцентными свойствами, таких как хвощ *Equisetum arvense*, фисташка *Pistacia atlantica*, ахироклина *Achyrocline bogotensis* и некоторых грибы. В научных работах отмечались потенциальные лечебные свойства гиспидина, как в виде самостоятельного соединения, так и в качестве компонента в составе экстрактов с другими биологически активными веществами. Для

гиспидина были описаны кардиопротекторный, нейропротекторный, антидиабетический и цитопротекторный эффекты, связанные с антиоксидантным и противовоспалительным действием.

На сегодняшний день известно крайне ограниченное количество поликетидсинтаз, осуществляющих синтез гиспидина. Однако предполагается, что спектр таких ферментов гораздо шире.

Поликетидсинтазы сами по себе представляют интерес для биотехнологии как ферменты, производящие соединения с ценными для человека свойствами, используемыми в различных отраслях сельского хозяйства, медицины и промышленности. Связь структуры и функции данных ферментов, рациональный дизайн продуцируемого поликетиды, увеличение выхода целевого продукта – вопросы, которые часто изучают в контексте данных ферментов. Таким образом, расширение знаний о поликетидсинтазах имеет высокую научную и практическую ценность.

В своей работе ПАЛКИНА К.А. поставила целью найти и изучить ферменты биосинтеза гиспидина из неблюминесцентных грибов и растений, а также создать с их помощью гибридный блуминесцентный каскад в гетерологических системах.

Для достижения этой цели автором были сформулированы задачи, включающие поиск поликетидсинтаз, ранее описанных в других исследовательских работах, а также использование биоинформатических подходов. Кроме того, были запланированы подтверждение функционирования выбранных ферментов, тестирование созданного гибридного каскада в разных гетерологических системах и создание автономных блуминесцентных линий *Nicotiana benthamiana*.

Для поиска и скрининга поликетидсинтаз, продуцирующих гиспидин из кофейной кислоты, ПАЛКИНА К.А. использует систему блуминесцентного каскада *N. nambi*. Ферменты *N. nambi*: гиспидин-3-гидроксилаза и люцифераза, катализируют трансформацию гиспидина в люциферин и его окисление с испусканием света. Эта система делает возможной оценку функционирования поликетидсинтаз *in vivo*, путем регистрации блуминесцентного сигнала. Более того, такая система скрининга может быть адаптирована для использования в различных гетерологических системах, ранее демонстрировавших способность к блуминесценции, включая клетки дрожжей, млкопитающих и растений.

Научная новизна. В диссертационной работе ПАЛКИНА К.А. описывает тестирование поликетидсинтаз неблюминесцентных грибов, включающее в себя анализ мутантных форм этих ферментов с удаленными доменами. Автор показывает использование ферментов биосинтеза гиспидина из неблюминесцентных организмов для поддержания блуминесценции совместно с другими ферментами *N. nambi*. Так, был исследован фермент из *Huophiloma sublateralitium*, отличающийся по доменной организации от описанных ранее гиспидинсинтаз грибов, но

способный поддерживать свечение совместно с гиспидин-3-гидроксилазой и люциферазой *N. nambi*. Однако подтвердить продукцию гиспидина поликетидсинтазой из *Hypholoma sublateritium* автору не удалось. Впервые в работе ПАЛКИНОЙ К.А. была продемонстрирована возможность функционирования биолюминесцентного каскада *in vivo* на основе не только кофейной кислоты, но и других гидроксикоричных кислот, таких как кумаровая и феруловая, с испусканием света различных спектров.

Также в работе ПАЛКИНОЙ К.А. проведен поиск и скрининг поликетидсинтаз III типа совместно с 4-кумароил-КоА-лигазами из растений. Автор создает гибридный каскад с ферментами биосинтеза гиспидина из растений и ферментами из *N. nambi*, катализирующими превращение гиспидина в люциферин и затем, с испусканием света, – в оксилуциферин. Функционирование такого гибридного каскада диссертант демонстрирует в клетках дрожжей и млекопитающих при добавлении кофейной кислоты. В работе также проведено сравнение гибридного каскада с другими известными репортерными люциферин-люциферазными реакциями в клетках дрожжей и растений. Благодаря проведенной работе удалось также показать автономное свечение гибридного каскада в клетках растений и создать автономно светящиеся линии *N. benthamiana*. Кроме того, проведен ряд исследований с созданными автономно люминесцирующими линиями *N. benthamiana*, которые позволили определить лимитирующий фактор, ограничивающий яркость свечения растений. Так реакция, катализируемая поликетидсинтазой III типа, ограничивала общий уровень свечения стабильных линий *N. benthamiana*, экспрессирующих гибридный биолюминесцентный каскад, однако механизм реализации этого еще предстоит установить.

Структура и содержание диссертации. Работа ПАЛКИНОЙ К.А. написана по стандартному плану, изложена на 146 страницах, включает в себя введение, список сокращений, обзор литературы, материалы и методы, результаты и их обсуждение, выводы и список цитируемой литературы, включающий в себя 253 источника. Текст работы содержит 39 рисунков, 2 таблицы в основном тексте и 6 в приложении.

Обзор литературы. Обзор литературы представлен в главе I и включает в себя описание биологической роли гидроксикоричных кислот в растениях и грибах. После этого в главе I рассмотрены ферменты, синтезирующие гиспидин и медицинские свойства этого поликетиды; описана роль гиспидина в процессе биолюминесценции. Отдельный подраздел обзора литературы посвящен подходам, которые применяются для гетерологической экспрессии генов ферментов биосинтеза поликетидов. Обзор литературы написан подробно и дает представление читателю о контексте изучаемой темы и современным подходам, которые применяются для ее исследования.

Объекты и методы исследования. Раздел «Материалы и методы» включает в себя описание различных экспериментальных подходов, использованных в исследованиях. В работе применен широкий спектр методов и подходов, автором продемонстрирован высокий уровень владения современными методами биохимии, физиологии растений, цитологии, микробиологии, молекулярной биологии и т.д., что отражает высокую профессиональную подготовку диссертанта.

Результаты. В разделе «Результаты и обсуждение» в главе III ПАЛКИНА К.А. описывает полученные результаты проведенных экспериментов, сопровождает их графиками, а также приводит их интерпретацию. Результаты хорошо структурированы и наглядно проиллюстрированы.

Основные результаты и выводы диссертации 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 7 научных конференциях. Рукопись автореферата емко и точно отражает основное содержание диссертации.

Замечания и вопросы по диссертационной работе. Принципиальных замечаний по работе не имеется, однако на несколько моментов хотелось бы обратить внимание Ксении Андреевны.

1) В работе автор исследует биолюминесцентный каскад гриба *N. nambi*, включающий в себя ферменты цикла кофейной кислоты: люциферазу (nnLuz), гиспидин-3-гидроксилазу (nnH3H), кафеоилпируватгидролазу (nnCPH) и гиспидинсинтазу (nnHisps). Последний фермент автор замещает поликетидсинтазами небиолюминесцентных грибов или растений для проверки их способности синтезировать гиспидин и поддерживать тем самым свечение при добавлении субстрата или автономно. При этом не до конца остается отражена роль nnCPH – фермента, который используют для работы в растениях, но отсутствует при сравнении в клетках дрожжей и млекопитающих.

2) В работе встречаются стилистические погрешности и пунктуационные ошибки. Список сокращений неполный и не содержит расшифровки: RLU (относительные единицы люминесценции). Расшифровки pEF1 α , BGN, BeYDV, TMV – приведены в тексте, но отсутствуют в разделе «Список сокращений». Сокращение поликетидсинтаз (PKS, ПКС) и синтазы жирных кислот имеет 2 варианта названия (FAS, СЖК) – лучше было бы ограничиться одним.

Отмеченные выше замечания не снижают общего впечатления о работе как о квалифицированном научном труде высокого уровня.

Результаты данной работы имеют важное значение для оптимизации гетерологического биосинтеза поликетидов гиспидина, дальнейшего изучения биолюминесцентной системы грибов и

ее функционирования в разных организмах, а также могут найти практическое применение в биологии и биотехнологии.

Заключение. На основании всего вышеизложенного можно заключить, что диссертационная работа ПАЛКИНОЙ К.А. на тему «Ферментов биосинтеза поликетидов гиспидина из кофейной кислоты» 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 с изменениями Постановлений Правительства РФ от: 21.04.2016 г. № 335; 02.08.2016 г. № 748; от 29.05.2017 г. № 650; 20.03.2021 г. №426; 11.09.2021 г. №1539; 26.09.2022 г. №1690; 26.01.2023 г. №101; 26.10.2023 г. №1786; 25.01.2024 г. №62), а ее автор ПАЛКИНА Ксения Андреевна 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 управляемого фотобиосинтеза Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института физиологии растений им. К.А. Тимирязева «27» марта 2025 г., протокол №23.

Главный научный сотрудник,
заведующий лабораторией
управляемого фотобиосинтеза ИФР РАН,
доктор биологических наук,
член-корреспондент РАН

Аллахвердиев Сулейман Ифхан-оглы

Федеральное государственное
бюджетное учреждение науки
Институт физиологии растений
им. К.А. Тимирязева Российской
академии наук (ИФР РАН)

127276, г. Москва,
ул. Ботаническая, д. 35
Тел.: +7 (499) 678-54-00
E-mail: ifr@ippras.ru

Подпись д.б.н. Аллахвердиева С.И. заверяю.
Ученый секретарь ИФР РАН

к.б.н. Лобус Николай Васильевич