

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Палкиной Ксении Андреевны
«Ферменты биосинтеза поликетидов гиспидина из кофейной кислоты»,
представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 1.5.3 – Молекулярная биология

Актуальность темы диссертации

Биолюминесценция грибов представляет собой новый инструмент для визуализации биологических процессов. Изучение ферментов биосинтеза гиспидина позволяет усовершенствовать репортерные системы для научных и медицинских целей. Система на основе гиспидина может стать альтернативой традиционным люциферин-люциферазным реакциям (например, светлячка или морских организмов), обладая потенциалом для многоцветной визуализации. Диссертационная работа Палкиной Ксении Андреевны посвящена исследованию ферментов – поликетидсинтаз (ПКС), участвующих в биосинтезе гиспидина из кофейной кислоты, обнаруженных как в растениях, так и в небиолюминесцентных грибах, а также созданию с их помощью гибридного биолюминесцентного пути в сочетании с люциферазой (nnLuz) и гиспидин-3-гидроксилазой (nnH3H) биолюминесцентного гриба *Neonothopanus nambi*. Исследование основано на применении неполной биолюминесцентной системы *N. nambi* в качестве репортерной для поиска ферментов, способных производить гиспидин, что позволило оценить функционирование гибридного пути в разных гетерологических системах, включая клетки дрожжей, млекопитающих и растений. Таким образом, актуальность работы неоспорима благодаря расширению представлений о ПКС разных, эволюционно далеких организмов, что не противоречит использованию ферментов из них для воссоздания гибридного биолюминесцентного пути и даже создания автономно светящихся растений.

Научная новизна исследования

Изучение субстратной специфичности ПКС и механизмов их работы помогает понять эволюцию метаболических путей и механизмы регуляции биосинтеза вторичных метаболитов. Выявление лимитирующих стадий в биолюминесцентном каскаде способствует рациональной инженерии метаболических путей.

Структура и общая характеристика работы

Диссертация построена по традиционному плану и содержит разделы: «Введение», «Актуальность темы исследования», «Степень разработанности области исследования», «Цели и задачи исследования», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Выводы». Диссертация представлена на 146 страницах и содержит 39 рисунков, 2 таблицы, 6 приложений, а также список литературы, включающий 253 источника.

В разделе «Введение» диссертантом сформулирована фундаментальная проблема, на решение которой направлена диссертационная работа, обозначена научная новизна и актуальность диссертации. Автор ставит перед собой цель - поиск и изучение ферментов

биосинтеза гиспидина из неблюминесцентных организмов (грибов и растений) для создания на их основе гибридной биоллюминесцентной системы в гетерологических хозяевах, затем формулирует соответствующие последовательные задачи для ее достижения. В главе «Обзор литературы» автор описывает биологическую роль и метаболизм гидроксикоричных кислот – субстратов поликетидсинтаз – в растениях и грибах, а также все, что известно о биосинтезе гиспидина в этих организмах. К.А. Палкина кратко формулирует потенциально ценные для медицины свойства гиспидина и описывает его роль в биоллюминесценции грибов, как предшественника люциферина. Отдельный раздел «Обзора литературы» посвящен гетерологичной экспрессии генов ферментов биосинтеза поликетидов и подходам, которые применяются в этой области для повышения выхода целевого продукта. В целом, обзор литературы полностью соответствует тематике диссертации, понятен и подробен, предваряет собственные исследования автора.

Работа выполнена на современном методическом уровне. К.А. Палкиной освоен и применен комплекс молекулярно-биологических, микробиологических, биохимических, биоинформатических и статистических методик. Все они описаны в соответствующем разделе на уровне детальности, позволяющем воспроизвести полученные результаты.

Глава 3 «Результаты и их обсуждение» четко и логично описывает проделанную экспериментальную работу, проведенные исследования отражают поставленные задачи и демонстрируют их решение. На первом этапе проводился поиск ферментов биосинтеза гиспидина среди ПКС неблюминесцентных грибов и описана семидоменная *hsPKS* из *Hypholoma sublateritium*, которая может поддерживать свечение совместно с *nnLuz* и *nnH3H* не только при добавлении кофейной кислоты, но и других субстратов – п-кумаровой и феруловой кислот. На втором этапе К.А. Палкиной рассмотрен ПКС III типа и 4-кумароил-КоА-лигазы из разных растений, проведен анализ функционирования этих ферментов в клетках дрожжей, млекопитающих и растений. В работе впервые показана продукция гиспидина широким набором ферментов из различных растений. Также впервые создан гибридный биоллюминесцентный каскад, включающий в себя ферменты из растений и гриба *N. nambi*, способный функционировать в разных гетерологических хозяевах, в том числе показавший способность генерировать автономное свечение в растениях при временной экспрессии и на стабильных линиях. Всего соискатель анализирует в работе 28 ферментов поликетидсинтаз и 4-кумароил-КоА-лигаз из 19 биологических видов, к которым относятся грибы порядка *Agaricales*, растения различных отделов, включая мхи и папоротники, а также цветковые растения 10 разных семейств, таких как *Brassicaceae*, *Poaceae*, *Solanaceae*, *Thymelaeaceae*, *Hydrangeaceae*, *Polygonaceae*, *Haemodoraceae*, *Piperaceae*, *Plumbaginaceae*, *Fabaceae*.

Теоретическая и научно-практическая значимость исследования

Результаты работы К.А. Палкиной формируют теоретическую базу для понимания эволюции, регуляции и инженерии метаболических путей, связанных с биосинтезом поликетидов, а также создают основу для разработки новых биотехнологических

инструментов на основе биолюминесценции. Исследование раскрывает механизмы работы ПКС грибов и растений, включая их субстратную специфичность, доменную организацию и пути циклизации промежуточных продуктов. Демонстрация способности ПКС III типа растений синтезировать гиспидин расширяет представления о функциональном разнообразии этих ферментов, ранее известных преимущественно в контексте синтеза флавоноидов и стильбенов. Сравнение ПКС биолюминесцентных и небиолюминесцентных грибов позволяет выдвинуть гипотезы о ключевых эволюционных изменениях (например, утрата доменов KR/DH), которые могли способствовать возникновению биолюминесценции. Работа подтверждает гипотезу о широкой субстратной специфичности ПКС и ферментов биолюминесцентного каскада (H3H, Luz), способных использовать не только кофейную, но и кумаровую/феруловую кислоты. Обнаружение различий в спектрах свечения при использовании разных субстратов указывает на возможность тонкой регуляции биолюминесценции через метаболический инжиниринг. Предсказание пространственной структуры ПКС с помощью AlphaFold и анализ доменной организации позволяют предложить новые модели каталитического механизма, включая роль консервативных аминокислотных остатков (например, Cys-His-Asn у ПКС III типа).

Разработка компактных генетических конструкций (например, ПКС III типа растений) упрощает их использование в вирусных системах доставки, расширяет применение таких конструкций в исследованиях растений и клеток млекопитающих. Возможность работы с широким спектром субстратов (кофейная, кумаровая, феруловая кислоты) делает систему гибкой для различных условий и задач. ПКС грибов и растений способны синтезировать гиспидин и его аналоги, которые востребованы в медицине (антиоксидантные, противовирусные, противоопухолевые свойства). Оптимизация гетерологичной экспрессии ПКС в дрожжах, растениях и клетках млекопитающих может повысить выход целевых продуктов для промышленного применения. Демонстрация автономного свечения растений и клеток открывает перспективы для мониторинга физиологических процессов в реальном времени. Результаты исследования могут быть применены в фармакологии, сельском хозяйстве и экологическом мониторинге.

Степень обоснованности научных положений, выводов и рекомендаций, сформулированных в диссертации

Автором постулировано шесть положений, выносимых на защиту, каждое из которых характеризует отдельную часть работы, подкрепленную фактическим экспериментальным материалом. Перечисленные положения далее раскрываются и обсуждаются в тексте диссертации. Сделанные выводы обоснованы и полностью отражают результаты работы.

Основные результаты диссертационной работы в полной мере представлены в трех публикациях в высокорейтинговых рецензируемых научных журналах, индексируемых в базах данных Web of Science, Scopus и в «Белом списке» научных журналов

Министерства науки и высшего образования Российской Федерации. Результаты представлены на ведущих международных конгрессах и конференциях.

Вопросы и замечания

Серьезных недостатков и противоречий в диссертации нет, вывод соответствуют поставленным целям и задачам. Работа содержит незначительное количество стилистических и пунктуационных ошибок.

Как и в любом научном исследовании, к работе К.А. Палкиной можно предъявить ряд вопросов и замечаний:

1. Раздел 3.4 «Взаимодействие cgPKS, hsPKS, gcPKS с аналогами кофейной кислоты». Несмотря на регистрацию биолуминесценции при использовании hsPKS, ВЭЖХ-МС/МС не подтвердил синтез гиспидина. Это ставит под сомнение специфичность фермента и требует дополнительных исследований для идентификации реального продукта (например, других стирилпионов).

2. Наблюдаемая гибель дрожжей при добавлении смеси феруловой и кофейной кислот (раздел 3.4) не сопровождалась анализом механизмов токсичности. Неясно, связан ли эффект с самими субстратами, их метаболитами или побочными продуктами реакций.

3. Удаление доменов (KR, DH) в cgPKS, hsPKS и gcPKS основывалось на предсказаниях алгоритма HMMER, которые частично противоречили данным AlphaFold 3.0. Может ли это привести к созданию нефункциональных мутантов и пересмотру стратегии направленного мутагенеза?

4. Автором описана способность гибридного пути производить свечение в клетках дрожжей при добавлении аналогов кофейной кислоты. В связи с тем, что кумаровая и феруловая кислота являются метаболитами фенилпропаноидного пути растений, возможно, ПКС III типа из растений оказались бы более эффективными для поддержания свечения гибридного пути с этими аналогами? Проверялись ли эти гидроксикоричные кислоты во второй части работы, где описаны ферменты из растений?

5. Какие гипотезы отличия в яркости стабильных линий *N. benthamiana*, экспрессирующих гибридную биолуминесцентную систему, могут быть протестированы, кроме тех, что уже рассмотрены в работе?

Вышеперечисленные замечания и комментарии ни в коем случае не снижают очень высокий уровень представленной работы. Автореферат полностью отражает содержание диссертации, тщательно оформлен и хорошо проиллюстрирован.

Заключение

Полученные результаты и положения диссертационной работы имеют важное научное и практическое значение. Диссертационная работа Палкиной Ксении Андреевны «Ферменты биосинтеза поликетидов гиспидина из кофейной кислоты» представляет собой целостное и завершённое исследование по актуальной теме, выполненное на высоком методологическом уровне, результаты которого вносят важный вклад в развитие молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии.

Диссертационная работа Палкиной Ксении Андреевны 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.

Официальный оппонент

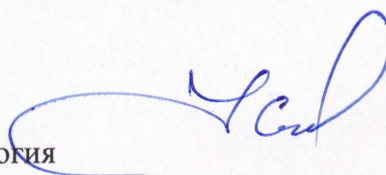
главный научный сотрудник,

заведующий лабораторией технологий

молекулярной диагностики ИМБ РАН

Доктор биологических наук

по специальности 03.01.03. Молекулярная биология



Грядун Д.А.

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН).

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32.

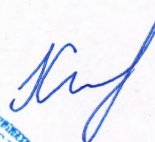
Тел. +7(499) 135-23-11. E-mail: isirfo@eimb.ru

Грядун Дмитрий Александрович. Тел. +7(916) 126-51-91. Эл. почта grad@biochip.ru

Подпись Грядунова Дмитрия Александровича удостоверяю:

Ученый секретарь ИМБ РАН, к.ф.-м.н.

21 апреля 2025 г.



Коновалова Е.В.

