



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

15.01.2019

№ 85-01-19/23

На №

от

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФИЦ Биотехнологии РАН,
член-корреспондент РАН

В.О. Попов

15 » января 2019 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» о научно-практической значимости диссертационной работы Котлобай Алексея Анатольевича на тему: «Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 – молекулярная биология

Диссертационная работа А.А. Котлобай посвящена поиску и клонированию люциферазы грибов – нового, неизвестного фермента. Люциферазы являются ключевыми компонентами ферментативных систем, обеспечивающих явление биолюминесценции различных видов живых организмов. К настоящему моменту известно о существовании более 40 различных типов биолюминесцентных систем, включающих в себя еще больше различных люцифераз. Однако, несмотря на широкую распространенность явления биолюминесценции среди видов живых существ, обитающих как на суше, так и в море, большинство биолюминесцентных систем остаются не изученными на данный момент. За более чем вековую историю изучения были найдены и клонированы всего несколько различных люцифераз: люцифераза бактерий, люциферазы системы D-люциферина (люциферазы светлячка, жука шелкоуна и железнодородных червей), целентеразин-зависимые люциферазы коралла *Renilla*, креветок семейства *Oplophoridae* и веслоногих ракообразных *Copepoda*, люциферазы биолюминесцентных систем, использующих люциферин *Cypridina*, люциферазы биолюминесцентных систем динофитовых водорослей. Открытие вышеперечисленных ферментов позволило создать большое число различных биолюминесцентных методов для биологии и медицины, спектр которых постоянно расширяется за счет получения новых мутантных форм люцифераз с улучшенными характеристиками. Разработанные инструменты используются для определения различных веществ с помощью клеток-репортеров, скрининга лекарственных препаратов, в том числе при подборе оптимальных условий для

проведения химиотерапии рака, и исследования белок-белковых взаимодействий. Отдельно стоит отметить применение билюминесцентных технологий для биоимаджинга, позволяющего визуализировать процессы, протекающие внутри живого организма в режиме реального времени (*real time in vivo whole body imaging*). Однако, наличие различных недостатков и ограничений, сужающих возможности использования и применения этих методик, стимулирует дальнейшее изучение природных билюминесцентных систем с целью поиска новых люциферинов и люцифераз, что важно для расширения спектра методов и улучшения уже существующих инструментов анализа. Таким образом, клонирование новой люциферазы грибов представляет большой научный интерес для биологии и медицины не только с фундаментальной, но и с практической точки зрения. Поэтому важность и актуальность диссертационной работы А.А. Котлобай не подлежит никакому сомнению.

Диссертационная работа построена по традиционному плану. Она состоит из введения, обзора литературы, описания использованных материалов и методов, изложения результатов и их обсуждения, выводов, приложений и списка цитированной литературы, включающего 327 источников. Работа изложена на 132 страницах, проиллюстрирована 43 рисунками и 7 таблицами.

Глава «Обзор литературы» содержит 6 разделов. После краткого введения, подготавливающего читателя к восприятию материала основной части обзора, автор переходит к детальному рассмотрению описанных к настоящему времени билюминесцентных систем. Каждый из последующих пяти разделов содержит описание одной из билюминесцентных систем, для которых известны оба ключевых участника – люциферин и люцифераза. Все они содержат краткое описание истории открытия и изучения системы, основную информацию по структуре ее люциферина и описание биохимических свойств люциферазы. Также приводятся данные по структурам люцифераз, в тех случаях, когда структура установлена. Возможно, здесь имело бы смысл добавить больше информации о применении каждой конкретной люциферазы, особенно учитывая тот факт, что данный тип ферментов имеет в первую очередь большое практическое значение с точки зрения применения в различных методах биомедицинских исследований.

В целом, обзор литературы содержит обширный, хорошо систематизированный и подробно проанализированный набор данных литературы, суммирующий данные о структуре и биохимических свойствах известных на данный момент природных люцифераз. Он читается с большим интересом и наглядно свидетельствует о том, что диссертант прекрасно ориентируется в имеющейся литературе по рассматриваемым вопросам. Помимо этого, обзор полностью исполняет свою главную функцию – он предоставляет читателю всю необходимую информацию для последующего восприятия экспериментального материала диссертационной работы.

Глава «Материалы и методы» изложена на 15 страницах и содержит подробное описание экспериментальных подходов, использованных в ходе выполнения работы. Использован большой набор современных методик: электрофорез, в том числе двумерный и в нативных условиях, высокоэффективная жидкостная хроматография, масс-спектрометрический анализ, методы генной инженерии, экспрессия и очистка

рекомбинантных белков из различных типов клеток и т.д. Значительное внимание уделено методике регистрации люминесценции в клетках и живых организмах с помощью системы IVIS. Отдельно стоит отметить разработку *de novo* методик выделения и очистки люциферазы грибов из мицелия. Наличие всех необходимых контролей в экспериментах, а также проведение опытов в необходимом для статистической значимости результатов количестве свидетельствуют о достоверности полученных результатов.

Глава «Результаты и обсуждения» состоит из 3 разделов. Первый раздел посвящен получению очищенного препарата люциферазы из мицелия гриба *Neonothopanus nambi*, пригодного для масс-спектрометрического исследования. Для достижения данной цели была разработана оригинальная методика выделения изучаемого фермента непосредственно из мицелия гриба и подобраны условия его очистки с использованием хроматографических и электрофоретических методов. Затем очищенный образец был проанализирован методом масс-спектрометрии. Стоит отметить, что в конце данного раздела автор пишет, что результаты экспериментов были противоречивы и не позволили однозначно определить люциферазу среди найденных кандидатов, однако наличие данного фермента среди них было подтверждено результатами экспериментов, представленных в следующем (втором) разделе. Несмотря на то, что последовательность гена люциферазы была найдена в других экспериментах, присутствие данного раздела позволяет обозреть весь путь поиска новой люциферазы, который велся несколькими параллельными путями.

Если первый раздел был посвящен поиску люциферазы методами классической биохимии, то во втором разделе описываются результаты поиска гена люциферазы с помощью методов молекулярной биологии. Данные эксперименты велись параллельно с теми, которые описаны в первом разделе. На основе РНК, выделенной из мицелия гриба *N. nambi*, была создана библиотека кДНК, которая затем была клонирована в клетки дрожжей, среди которых в результате были обнаружены клоны, несущие ген люциферазы. Все они были изолированы, и сиквенирование показало наличие во всех одной и той же последовательности гена люциферазы гриба *N. nambi*. Диссертантом было показано, что данная последовательность является уникальной и никаких ее гомологов в открытых базах данных найдено не было. Найденная последовательность была затем клонирована в экспрессионный вектор для получения рекомбинантного белка, в количествах, достаточных для биохимических исследований. Сравнение спектров биолюминесценции рекомбинантного белка и мицелия гриба *N. nambi* показало их практически полное совпадение, что подтверждает идентичность рекомбинантного и нативного ферментов. Помимо этого, для решения выявленных в ходе выполнения работ проблем с экспрессией данного гена в прокариотических клетках, автором были получены укороченные функциональные фрагменты люциферазы. И, хотя значительная часть рекомбинантного белка, полученного в бактериальных клетках, по-прежнему оставалась в нерастворимой фракции (тельца включения), наличие люминесцентной активности в растворимой фракции свидетельствовало о том, что автору удалось, пусть и с невысокой эффективностью, получить функциональный фермент при экспрессии его гена в бактериальных клетках. Полученные результаты говорят о потенциальной возможности в будущем полностью решить данную проблему. Кроме того, автору удалось разработать

методику ренатурации люциферазы из телец включения, что является важным с точки зрения биотехнологии для применения изучаемого фермента в биомедицинских методах анализа, поскольку именно бактериальная система экспрессии является наиболее простой и дешевой среди всех известных на данный момент. После прочтения данного раздела возникает, однако, вопрос – почему не была разрешена структура изучаемого фермента, если была разработана методика его ренатурации, позволяющая получить препарат белка, пригодный для исследования методом ЯМР или для получения кристалла?

Диссертант провел анализ имеющихся в открытом доступе геномов различных биоллюминесцентных грибов и нашел в них во всех ген люциферазы. Все найденные гены были гуманизированы, синтезированы в виде линейных фрагментов ДНК и клонированы для последующей экспрессии в клетках млекопитающих. Анализ этих клеток показал, что все найденные гены действительно являются генами люциферазы, поскольку продукты их экспрессии обладают люминесцентной активностью при реакции с люциферинном грибов и дают сигнал минимум на два порядка превосходящий сигнал от контрольных клеток. На основании этих данных автор приходит к обоснованному выводу о том, что найденный в ходе работы ген люциферазы присутствует и в других видах биоллюминесцентных грибов, а значит, данный ген является геном люциферазы грибов, а не только одного вида *N. Nambi*. Более того, уникальность данного гена, подтвержденная отсутствием описанных гомологов, позволяет говорить об открытии нового семейства белков – люциферазы грибов.

Третий раздел главы «Результаты и их обсуждение» полностью посвящен применению люциферазы грибов в биоимиджинге. Здесь представлены изображения, наглядно демонстрирующие потенциал использования открытой люциферазы в биоимиджинге. Описанные результаты показывают возможность использования этой люциферазы для мечения отдельных эукариотических клеток как в культуре, так и в рамках целого организма, что показано на примере живой мыши и эмбриона шпорцевой лягушки (*Xenopus laevis*). Представленные в данном разделе результаты говорят о большом потенциале для практического применения данного фермента.

Завершая анализ диссертационной работы А.А. Котлобай, можно заключить, что это исследование посвящено интересной и актуальной проблеме. Работа представляет собой полноценное завершённое научное исследование, выполненное на высоком современном экспериментальном уровне с использованием комплекса различных методических приемов. Все полученные данные хорошо документированы и их достоверность не вызывает сомнений. Сделанные в работе выводы вполне обоснованы и базируются на комплексном применении разных методов исследования. Высказанные замечания носят сугубо полемический характер, нисколько не снижая при этом общего прекрасного впечатления от проделанной автором работы. Полученные результаты оригинальны и отражены в 3 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки РФ для публикации основных результатов диссертационных работ. Материалы диссертационной работы А.А. Котлобай доложены на международных и российских научных конференциях. Автореферат и опубликованные работы полностью отражают основное содержание работы.

Результаты, полученные в ходе данной работы, могут быть использованы в исследованиях, проводимых в Федеральных государственных бюджетных учреждениях

науки – Институте теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Институте белка РАН, Институте биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Институте биофизики Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Федеральный исследовательский центр СО РАН», а также при чтении курсов лекций в медицинских и биологических вузах.

По актуальности, новизне, научному и методическому уровню, достоверности, теоретической и практической значимости полученных результатов диссертация Котлобай Алексея Анатольевича соответствует критериям, установленным "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), предъявляемым к работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03» - молекулярная биология, а её автор заслуживает присвоения искомой степени.

Отзыв заслушан, обсужден и утвержден на совместном научном семинаре лаборатории структурной биохимии белка и группы белок-белковых взаимодействий Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук» 26 декабря 2018 г. (Протокол № 1).

Заведующий лабораторией структурной биохимии белка
Института биохимии им. А.Н. Баха
Федерального государственного учреждения
«Федеральный исследовательский центр
«Фундаментальные основы биотехнологии»
Российской академии наук»,
доктор биологических наук, профессор

Дмитрий Иванович Левицкий

Адрес: 119071, Российская Федерация
г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2
Тел.: +7 (495) 952-13-84
Электронная почта: Levitsky@inbi.ras.ru

Подпись д.б.н., проф. Д.И. Левицкого заверяю

Ученый секретарь ФИЦ биотехнологии РАН,
кандидат биологических наук

А.Ф. Орловский

15 января 2019 года

