

## **ОТЗЫВ**

Официального оппонента на диссертационную работу Котлобай Алексея Анатольевича «Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов», представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - молекулярная биология.

### **Актуальность темы диссертационной работы**

Биолюминесценция – способность представителей различных групп живых организмов светиться - обусловлена наличием у этих организмов специальных ферментов – люцифераз. Люциферазы различных групп живых организмов различаются как по своему происхождению, так и по своему строению. Субстратом для люцифераз служат разнообразные по своему строению молекулы – люциферины.

В настоящее время описано несколько типов биолюминесцентных систем. Показано, что у различных групп живых организмов они возникали независимо в процессе эволюции.

В последние годы было показано, что детекторные системы, основанные на использовании люциферин-люциферазных реакций, могут использоваться в самых разнообразных областях современной науки – от исследования различных биохимических процессов внутри клетки до биоимиджинга многоклеточных организмов. Однако, некоторые ограничения, присущие известным природным формам таких систем, стимулируют как генно-инженерные исследования, нацеленные на получение модифицированных белковых форм, лишенных подобных недостатков, так и на поиск новых, до сих пор не охарактеризованных или вообще не описанных форм биолюминесцентных систем.

### **Научная новизна диссертационного исследования**

Поиск и исследование новых белковых молекул, обладающих искомыми свойствами, является сложной экспериментальной задачей. Для своей реализации такие задачи требуют уверенного знания и владения разнообразными молекулярно-биологическими, биохимическими, физико-химическими и генно-инженерными методами; требуют знания строения и функционирования объектов исследования; глубокого понимания основных биохимических процессов, характерных для этих объектов. Данные, полученные при выполнении рецензируемой работы, помогут в дальнейшем лучше понять механизмы функционирования биолюминесцентных систем, а практические результаты, полученные в ходе выполнения работы будут способствовать расширению круга научных и практических исследований с применением биолюминесцентных систем.

### **Оценка содержания выполненной работы в соответствии с требованиями ВАК**

Рецензируемая диссертационная работа построена по традиционному плану и состоит из короткого, но четкого введения, достаточного по объему обзора литературы, подробного описания использованных материалов и методов, описания полученных результатов, их обсуждения, списка сокращений, списка цитированной литературы, включающего в себя 327 источников и 3 приложения, являющихся дополнительным материалом для раздела «Результаты и обсуждения». Работа изложена на 132 страницах, содержит 7 таблиц и 43 рисунка.

Обзор литературы состоит из шести больших глав и содержит достаточно подробное описание основных объектов исследований.

В литературном обзоре автор дает общую характеристику биолюминесцентным системам, представленных в различных видах животных. Подробно обсуждаются вопросы, связанные со строением и функционированием люцифераз различных видов животных; обсуждается механизм их действия, проводится сравнительный анализ ферментов из различных источников, рассматриваются и подробно обсуждаются различные известные на данный момент формы субстратов.

Особое внимание в литературном обзоре уделено описанию методов создания модифицированных форм фермента, отличающихся от белка дикого типа по интенсивности и спектру свечения, изменению (увеличению) термостабильности, уменьшению чувствительности фермента к изменению pH. Достаточно подробно рассмотрено использование природных форм люцифераз и их модифицированных аналогов для решения как научных, так и прикладных задач. Обсуждается, какие формы белка лучше использовать в тех или иных исследованиях.

В целом обзор литературы написан хорошим языком, содержит достаточный фактический материал и хорошо подготавливает читателя к восприятию основной части диссертационной работы.

Раздел «Материалы и методы» изложен на 14 страницах и содержит достаточно подробное описание основных экспериментальных подходов, использованных при проведении исследования. Особенно хочется отметить разнообразие методов, представленных в этом разделе. Это и многочисленные, и весьма разнообразные генно-инженерные методы, методы клеточной работы (с клетками дрожжей и клетками млекопитающих), разнообразные биохимические методы – хроматография, различные типы электрофоретического разделения как белковых молекул, так и нуклеиновых кислот, исследования ферментативной активности люцифераз, масс-спектрометрические исследования и их использование для определения аминокислотной последовательности белка; использование иммунохимических подходов и использование биоимиджинговых систем.

В качестве основного объекта исследований автором был выбран биолюминесцентный гриб *Neonothopanus nambi*. Для поиска и клонирования люциферазы этого гриба в работе использовались два подхода – выделение и очистка препарата гриба с последующим масс-спектрометрическим секвенированием и молекулярно-биологический подход, основанный на выделении РНК из биомассы мицелия, получения библиотеки кДНК с ее последующим клонированием и анализом в дрожжевой экспрессионной системе с целью поиска клонов, экспрессирующих активные формы фермента.

В результате проведенных исследований на первом этапе работы, автору удается определить первичную последовательность люциферазы *N. nambi*. А после выяснения нуклеотидной и аминокислотной последовательностей исследуемого белка была предпринята успешная попытка поиска гомологов у нескольких других видов грибов, геномы которых были получены из различных баз данных. Таким образом были идентифицированы последовательности гипотетических белков –

гомологов люциферазы из *N. pambí* для семи видов грибов, обладающих биолюминесцентными системами. Полученные данные использовали для экспрессии белков в клеточных линиях HEK293NT и HeLa. В результате впервые были получены активные формы еще семи люцифераз из семи различных видов грибов.

Вторая часть работы посвящена исследованию биохимических особенностей люциферазы из *N. pambí*; экспрессии этого белка и его фрагментов в различных экспрессионных системах. Был получен функционально-активный фрагмент фермента, не содержащий трансмембранного домена, исследованы спектры биолюминесценции люциферазы *N. pambí*, исследованы температурная и pH зависимость фермента. Была показана возможность экспрессии функционально-активного белка в прокариотической (*E.coli*) экспрессионной системе.

Заключительная часть работы посвящена исследованию возможности использования люциферазы *N. pambí* для введения люминесцентной метки в клетки млекопитающих. Было показано, что после трансфекции в клетках нескольких линий млекопитающих начинается экспрессия активной формы фермента. На основании полученных данных был сделан вывод, что по аналогии с ранее описанными биолюминесцентными системами, люцифераза *N. pambí* также может быть использована для мечения различных клеточных линий при проведении биохимических и биомедицинских исследований.

Текст диссертации и автореферата заканчивается четко сформулированными и хорошо аргументированными выводами, которые полностью соответствуют поставленным задачам.

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

- Литературный обзор диссертационной работы позволяет читателю получить представление о строении и функционировании биолюминесцентных систем различных представителей членистоногих, простейших и бактерий. Однако, к сожалению, литературный обзор не содержит никаких данных об основном объекте исследований - биолюминесцентной системе грибов.
- Список сокращений, использованных в работе, неполон и организован не оптимальным образом. Логично было бы разделить англо- и русскоязычные сокращения и расположить их в алфавитном порядке.
- К одному из наиболее значимых достижений автора можно отнести проведение предварительных исследований биохимических свойств люциферазы *N. pambí*. Однако, в работе автор ограничивается только описание полученных данных, не проводя сравнительного анализа исследуемого белка с гомологичными белками из других видов многоклеточных и одноклеточных организмов.
- В результате проведенного исследования температурной зависимости люциферазы *N. pambí* (Рисунок 40) автор убедительно показывает, что температурный оптимум фермента находится в диапазоне 10-20°C, а в диапазоне 34-38°C ферментативная активность белка приближается к очень низким, практически нулевым значениям. В то же время в эксперименте (Рисунок 42), описывающем инъекцию клеток линии СТ26 (экспрессирующих тот же белок) под

кожу экспериментального теплокровного животного (мышь) автор наблюдает ярко выраженную ферментативную активность люциферазы. К сожалению, автор не пытается объяснить противоречие, которое становится очевидным при сравнении результатов этих двух экспериментов. Остается неясным, почему в экспериментах *in vitro* фермент практически полностью терял свою активность при повышении температуры до 34°C, а в экспериментах *in vivo* оставался активным и при более высоких температурах.

- В разделе «Результаты и обсуждение» представлены хорошо и подробно описанные результаты экспериментов, которые позволяют читателю понять и оценить структуру и логику проведенного научного исследования. Однако, с точки зрения оппонента, вторая, часть этого раздела - «Обсуждение» - страдает излишней лаконичностью. Было бы уместно, если бы автор в разделе «Результаты и обсуждение» больше места и внимания уделил анализу и обсуждению полученных в ходе работы данных.

### **Оценка оформления диссертационной работы**

Диссертация изложена хорошим профессиональным языком с необходимым (и достаточным) количеством иллюстраций.

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

Результаты работы, безусловно, важны в научном отношении, так как автор впервые представляет данные о нуклеотидной последовательности генов новой группы люцифераз, характерных для нескольких видов люминесцентных грибов; впервые получил активную форму одного из представителей этой группы; описал его биохимические особенности. Помимо этого, результаты, представленные в диссертационной работе, имеют несомненный интерес и с практической точки зрения. Впервые было проведено успешное мечение люциферазой грибов клеток млекопитающих как в клеточной культуре, так и клеток внутри многоклеточного организма. Таким образом, была продемонстрирована возможность использования представителей новой группы ферментов в качестве уникальных инструментов при проведении самых разнообразных биохимических, клеточных и медико-биологических исследований.

### **Опубликование результатов диссертации в научной печати**

Основные результаты диссертации представлены в трех статьях (два международных журнала и один отечественный) и доложены на двух научных конференциях.

### **Содержание автореферата**

Содержание автореферата полностью соответствует основным положениям диссертации.

## Заключение

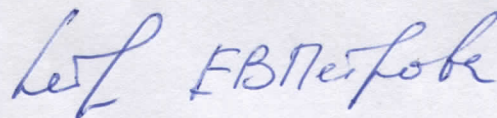
Высказанные замечания и комментарии ни в коей мере не уменьшают безусловных достоинств представленной диссертационной работы. Исследования А.А. Котлобай посвящены интересной и актуальной проблеме, выполнены на высоком методическом уровне и содержит целый ряд новых оригинальных данных, важных для понимания строения и функционирования большой группы ферментов, впервые описанной в диссертационной работе. По своему объему, оформлению и качеству полученных данных диссертационная работа 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.

Доктор биологических наук по специальности 03.01.04 - биохимия, профессор.  
Ведущий научный сотрудник кафедры биохимии  
Биологического факультета  
Федерального государственного бюджетного  
образовательного учреждения высшего образования  
«Московский государственный университет  
имени М.В. Ломоносова»,  
Адрес: 19991, Россия, Москва, Ленинские горы, д. 1,  
стр. 12, Биологический факультет МГУ.  
Тел.: +79859232248  
Email: [katrukha@mail.ru](mailto:katrukha@mail.ru)  
Катруха Алексей Генрихович



4 марта 2019 года

Подпись д.б.н. А.Г. Катрухи заверяю  
Ученый секретарь биологического факультета МГУ



Декаан биологического факультета  
Александр А. П. Керн

