

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01
на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки
Института биоорганической химии
им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук

20 марта 2019 года

Защита диссертации
на соискание ученой степени кандидата биологических наук

Котлобай Алексеем Анатольевичем

«Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов»

специальность: 03.01.03 - молекулярная биология

Москва - 2019

СТЕНОГРАММА

Заседания диссертационного совета Д 002.019.01 на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук от 20 марта 2019 года.

Председатель

диссертационного совета

д.х.н., академик РАН Иванов В.Т.

И.О. ученого секретаря

диссертационного совета

д.х.н. Уткин Ю.Н.

Из 30 членов совета присутствует 21 человек, из них докторов по профилю диссертации – 5.

1.	Академик РАН	Иванов Вадим Тихонович	(02.00.10)
2.	Д.физ.-мат.н.	Ефремов Роман Гербертович	(02.00.10)
3.	Чл.-корр. РАН	Липкин Валерий Михайлович	(03.01.06)
4.	Д.х.н.	Арсеньев Александр Сергеевич	(02.00.10)
5.	Д.х.н.	Безуглов Владимир Виленович	(03.01.06)
6.	Академик РАН	Богданов Алексей Алексеевич	(03.01.03)
7.	Академик РАН	Габибов Александр Габибович	(03.01.06)
8.	Д.х.н.	Дзантиев Борис Борисович	(02.00.10)
9.	Д.б.н.	Долгих Дмитрий Александрович	(03.01.03)
10.	Чл.-корр. РАН	Завриев Сергей Кириакович	(03.01.06)
11.	Д.х.н.	Зубов Виталий Павлович	(03.01.06)
12.	Д.б.н.	Лебедев Юрий Борисович	(03.01.03)
13.	Академик РАН	Лукьянов Сергей Анатольевич	(03.01.03)
14.	Академик РАН	Мирошников Анатолий Иванович	(03.01.06)
15.	Д.б.н.	Мурашев Аркадий Николаевич	(03.01.06)
16.	Д.х.н.	Овчинникова Татьяна Владимировна	(02.00.10)
17.	Д.б.н.	Патрушев Лев Иванович	(03.01.06)
18.	Д.х.н.	Румш Лев Давыдович	(03.01.06)
19.	Д.х.н.	Уткин Юрий Николаевич	(02.00.10)
20.	Д.х.н.	Шахпаронов Михаил Иванович	(02.00.10)
21.	Д.б.н.	Шпаковский Георгий Вячеславович	(03.01.03)

Иванов Вадим Тихонович: Сегодня у нас одна защита. Без всяких там разных, без приёмов к защите и прочее, и прочее. Так получилось. Это неотложный вопрос – необходимость провести защиту. И помогать мне будет сегодня не Олейников Владимир Александрович, а наш коллега. Представить или сами?

Уткин Юрий Николаевич: Уткин Юрий Николаевич.

Иванов Вадим Тихонович: Олейников сегодня делает доклад на президиуме Академии наук. Поэтому, я считаю, по вполне уважительной причине сегодня он поручил эту обязанность своему коллеге. Нет возражений против данной повестки дня? Я думаю, не должно быть. Всё предельно понятно. Переходим к защите Алексеем Анатольевичем Котлобаем кандидатской диссертации. Материалы личного дела, Юрий Николаевич, доложите.

Уткин Юрий Николаевич: Котлобай Алексей Анатольевич – гражданин Российской Федерации. В 2007 году окончил биологический факультет Московского государственного университета. По специальности «биохимия». С 2007 по 2010 года аспирант, а с 2010 года младший научный сотрудник Лаборатории молекулярных технологий для биологии и медицины, затем Лаборатории геномики адаптивного иммунитета. С 2015 года младший научный сотрудник Группы синтеза природных соединений, преобразованной впоследствии в Лабораторию химии метаболических путей. Кандидатский экзамен по специальности «молекулярная биология» сдан с оценкой «отлично». Работа выполнена в Лаборатории химии метаболических путей. Научный руководитель диссертационной работы доктор химических наук Ямпольский Илья Викторович. По теме диссертации опубликованы 3 статьи в научных журналах, входящих в базы «WEB OF SCIENCE» и «SCOPUS». Все необходимые документы в деле имеются. Объявление о защите и автореферат диссертации размещены на сайте ВАК 28 декабря 2018 года.

Иванов Вадим Тихонович: Вопрос, комментариев, замечаний обычно не бывает. Не вижу. Спасибо. Ну и слово диссертанту. Алексей Анатольевич, Вам 20 минут для доклада.

Котлобай Алексей Анатольевич:

(излагает основные положения диссертационной работы)

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо за доклад. Мы переходим к обсуждению. У кого возникли вопросы? Да, Александр Габибович.

Габибов Александр Габибович: Спасибо большое. Впечатляющие исследования. Я как-то сразу, может, немножечко примитивные хочу задать вопросы. Они меня обратили на 30 лет назад, когда я занимался вытаскиванием генов из библиотек экспрессионных. Скажите, пожалуйста, просто интересно, сейчас возможности совершенно другие. У Вас было несколько клонов. Как я понял, Вы обрадовались увидев клон, кажется, №7, и соединив его с Вашим клоном, полученным альтернативно, доказали, что это вот тот фермент, о котором Вы и говорите. А вот что представляли собой другие клоны? Потому что, ну не хочу удлинять вопрос, но это был большой фрагмент в науке, я его назвал энзимология фьюжн белков. И вот сидящий здесь академик Богданов, который оппонировал мою докторскую, вспомнит, я даже его включил тогда. Было очень интересно, что фрагмент активного центра привешенный, тогда делали фьюзы искусственно, чтобы они были активны. Что-то Вы можете сказать об этом пуле, скорее всего, функциональных фрагментов. Второй вот более примитивный. А Вы не пробовали

как-то фолдировать белок, полученный бестранкированным вот этим, что менее перспективно. Ну, два таких практически методических вопроса.

Котлобай Алексей Анатольевич: Что касается первого вопроса. Мы, конечно, анализировали эти 10 кандидатов с точки зрения того, что они из себя представляют. Но, на самом деле, это довольно гетерогенная группа белков. То есть, насколько я помню, прямых белков с показанной функцией среди них, может быть, был один или два. Большую часть можно было приблизительно представить...

Габибов Александр Габибович: То есть, это случайно...

Котлобай Алексей Анатольевич: К сожалению, да, при применении методов очистки из биоматериала изначального, там могут оказаться совершенно не связанные между собой белки просто в силу схожести каких-нибудь свойств.

Габибов Александр Габибович: Не, ну я так понял, что у Вас всё-таки на чашке индивидуальные клоны. Вы их орошали...

Котлобай Алексей Анатольевич: Нет, нет, нет! Я говорю про те 10 кандидатов, которые были получены в первой части работы. Что касается клонов, которые были найдены на чашках, их было несколько, они все содержали абсолютно одинаковую последовательность гена.

Габибов Александр Габибович: Они все были одинаковые? То есть, не было никаких...

Котлобай Алексей Анатольевич: Да, они все были с абсолютно одинаковой последовательностью.

Габибов Александр Габибович: И полная вот это Ваша удача, что вытащили...

Котлобай Алексей Анатольевич: Да, нам повезло, что все они оказались одинаковыми.

Габибов Александр Габибович: Да, потому что это неочевидно. Спасибо.

Котлобай Алексей Анатольевич: А что касается второго вопроса.

Габибов Александр Габибович: Рефолдинг Вы сделали.

Котлобай Алексей Анатольевич: Рефолдинг мы подбирали условия, я не включил это в доклад в силу нехватки времени.

Габибов Александр Габибович: Просто можно предполагать полезность такого белка.

Котлобай Алексей Анатольевич: Да, мы рефолдировали этот белок из телец включения. Но, к сожалению... Он оказался функциональным, нам удалось подобрать условия, чтобы он был функционален, но последующие попытки определить его структуру методами ЯМР или кругового дихроизма показали, что, видимо, структура, которую он там имеет, либо она не полностью собрана, и там есть подвижный участок. Не собранный. То есть, часть вокруг активного центра...

Габибов Александр Габибович: Но он был активен?

Котлобай Алексей Анатольевич: Да, он был активный, поэтому часть с активным центром собрана. Но, видимо, какой-то из концов подвижен, поэтому ни ЯМР, ни круговой дихроизм пока нам насчёт структуры ответ никакой не дали. Но эти эксперименты с рефолдингом удалось использовать в том плане, что мы смогли посмотреть некоторые биохимические свойства, имея блок в растворе. Функциональный.

Габибов Александр Габибович: Не хочу затягивать дискуссию, но Вы считаете, что подобраны были оптимальные условия или нет всё-таки? Потому что можно представить ситуацию, что у вас часть просто небольшая порция, то есть, белок гомогенен

как белок. Но небольшая его порция сложена правильно и осуществляет катализ, а остальная часть просто является той фракцией, которая понижает вашу каталитическую константу или V_{\max} . Вот какая здесь...

Котлобай Алексей Анатольевич: В целом, что касается оптимальности условий, то рефолдинг – это тема, которой для одного белка можно заниматься бесконечно для совершенствования. Да.

Габибов Александр Габибович: Я думал такой более научный вопрос задать. Ну хорошо, я понял. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: У меня родственный вопрос. Я понимаю, геном полный гриба, который продуцирует, заранее известен. Правильно?

Котлобай Алексей Анатольевич: Да.

Иванов Вадим Тихонович: И в этом геноме один участок кодирует ваш белок? Либо там есть серия родственных участков?

Котлобай Алексей Анатольевич: Насколько я помню этот кластер генов, это то, о чём, собственно, написана статья, которая под №1 в этом списке, это кластер генов, который кодирует гены биосинтеза, в том числе, люциферина. Там несколько ферментов, и они представлены именно в виде кластера генов, что, в принципе, у грибов довольно часто встречается. У них ферменты биосинтеза часто кластеризуются.

Иванов Вадим Тихонович: То есть, данная люцифераза, меня интересует, есть ли гомологи, закодированные с какими-то небольшими заменами аминокислот? Или там вот один сиквенс закодирован и всё, и больше ничего?

Котлобай Алексей Анатольевич: Насколько я помню, в рамках одного гриба последовательность была одна. Как бы в других грибах есть элементы гомологичные...

Иванов Вадим Тихонович: Была одна? Именно в этом грибе.

Котлобай Алексей Анатольевич: В других грибах есть элементы, аналогичные.

Иванов Вадим Тихонович: Именно в этом грибе.

Котлобай Алексей Анатольевич: Насколько я помню, один был кластер.

Иванов Вадим Тихонович: Хорошо. Есть ещё вопросы? Прошу.

Ефремов Роман Гербертович: Скажите, пожалуйста, Вы в докладе упомянули, что найденная аминокислотная последовательность была уникальная. Поиск в базах данных Вам не дал никаких гомологичных белков. А вместе с тем после этого приводите множественное выравнивание для большого набора, там порядка десятка других люцифераз. В чём тут противоречие?

Котлобай Алексей Анатольевич: Дело в том, что результаты выравнивания были сделаны по результатам анализа геномов. То есть, геномы, причём, геномы грибов *Neonothoropus nambí* и *Muscena citricolor*, насколько я помню, они делались вообще специально для этого проекта. То есть, их не было в открытых базах. А остальные существовали в виде геномов. И при попытке найти гомологичный белок, присутствующий здесь научный руководитель не даст соврать, действительно появлялась надпись, что гомологи не найдены. Потому что эти геномы существовали именно, они были выложены в открытый доступ именно в виде геномов. И они не были разобраны на отдельные гены.

Ефремов Роман Гербертович: То есть, это не фундаментальная, а это просто технологическая проблема. Не те базы данных, не в том объёме были взяты, чтобы делать такое громкое заявление. Правильно? Что это уникальные, впервые обнаруженные представители семейства.

Котлобай Алексей Анатольевич: Если считать, что люди, которые сделали геном, нашли все белки, которые есть в этом организме, то, наверное, да, Ваше утверждение именно такое. Но я лично считаю, что человек, который отсеквенировал геном, это не означает, что он нашёл все белки, которые есть в этом организме. Он, возможно, охарактеризовал все гены, которые есть в этом организме. А вот что касается белков, я не уверен, что это совсем верное утверждение.

Ефремов Роман Гербертович: В связи с этим второй вопрос. Глядя на список публикаций, в первой, там, по-моему, 40 соавторов, во второй – порядка 20. Вот Ваша персональная роль как соискателя? Вот Вы докладываете работу, а публикация – там 40 человек. Это как запрос на продолжить, да?

Котлобай Алексей Анатольевич: Да, я понимаю вопрос.

Ефремов Роман Гербертович: Ваша роль, и в чём научная новизна конкретно Вашей работы?

Котлобай Алексей Анатольевич: Вот эта публикация, в которой 40 авторов, она посвящена, там опубликована генетически кодируемая биолюминесцентная система из грибов. И она включает в себя помимо люциферазы ещё несколько ферментов. И то, что докладывал я – это только маленькая часть той работы. Она действительно была, можно сказать, первой частью в этой работе. До того, как мы нашли люциферазу, мы не могли найти остальные гены. И количество авторов объясняется тем, что эта работа очень комплексная, многоплановая. И необходимо было привлечение специалистов из довольно большого числа лабораторий, которые раскиданы по всему миру. И лично мой вклад в эту работу заключается именно в поиске и характеристике люциферазы. Это дало нам возможность в дальнейшем искать, рассматривать окружение этого гена в геноме, искать остальные ферменты, предполагать биосинтез и в конечном итоге вместе с остальными участниками данного проекта создать автономную генетически кодируемую биолюминесцентную систему, пригодную для эукариотических организмов.

Ефремов Роман Гербертович: Правильно ли я понимаю, что всё, о чём Вы рассказывали, это сделано лично Вами? Ваши результаты? Или там в тесном сотрудничестве?

Котлобай Алексей Анатольевич: Да, но некоторые результаты, конечно, были сделаны вместе с другими людьми. И, конечно же, в заключительном слове в благодарностях я обязательно упомяну всех, с кем я работал. Потому что большую современную разноплановую работу невозможно сделать в одиночку. Это, в общем-то, по статьям видно. И совершенно очевидно, что некоторые методы технически сложны. И они должны делаться специалистами.

Иванов Вадим Тихонович: Ещё вопросы. Сразу несколько. Иду слева направо давайте. Сначала с Вас.

Кузнецов Николай Юрьевич: Спасибо большое, меня пригласили. Я сам химик из ИНЭОСа. И у меня вопрос, скорее, общего характера. Во-первых, как Вы считаете, зачем вообще нужна биолюминесценция в грибах? Я понимаю, светлячки, морские организмы. А насчёт грибов? И второй вопрос. Сам люциферин окисляется кислородом воздуха, после этого процесса он безвозвратно теряется? Либо там существует процесс его рециклизации? Если да, то какой восстановитель в этом процессе?

Котлобай Алексей Анатольевич: Давайте, наверное, начну со второго вопроса. Да, процесс рециклизации существует. Оксилуциферин возвращается обратно в люциферин. Собственно, в этой работе, которая характеризует всю эту автономную

биоломинесцентную систему, она именно об этом. О том, что люциферин, переходя в оксильюциферин, обратно превращается в люциферин с помощью других ферментов. И первый вопрос. Я его ожидал, его всегда задают. В принципе, вопрос: зачем нужна биоломинесценция - он фундаментальный. И до сих пор обсуждаемый в научном сообществе. Потому что, очевидно, что сейчас известно, что, как минимум, около 40 раз независимо это явление возникало в разных группах живых организмов. И логично предположить, что причины возникновения этого явления были разные. Потому что считать, что это просто какой-то побочный процесс – не очень разумно. Он энергозатратен и слишком привлекает внимание. В разных группах организмов биоломинесценция играет разную роль. Упомянутые Вами светлячки или черви *Odontosyllis* используют это, для привлечения партнёров. Удильщики используют для привлечения жертвы. Есть интересная теория касательно динофлагеллят, что они используют биоломинесценцию для того, чтобы к моменту атаки привлечь внимание к атакующему хищнику ещё более крупных хищников, чтобы, погибая самому, спасти остальных. В случае грибов единого мнения нет. Есть интересное предположение, которое высказывают наши коллабораторы в Бразилии, в частности, Кассиус Стевиани. Он считает, что, возможно, биоломинесценция грибам, тропическим по крайней мере, нужна для привлечения насекомых, которые привлекаясь к грибам, способствуют разносу спор. И таким образом фактически это тоже участие в размножении, распространении собственного вида. Но единой, тем более доказанной теории – зачем биоломинесценция грибам, пока нет.

Иванов Вадим Тихонович: Татьяна Владимировна, у Вас вопрос был?

Овчинникова Татьяна Владимировна: Да. Спасибо большое Алексею, очень интересная работа. Как я поняла, люцифераза достаточно термолабильна? Когда Вы её нагреваете, она теряет уже после 30°C свою активность? Тем не менее, в экспериментах с мышами, где температура существенно выше, мы видим, что она активна. Вот как Вы...

Котлобай Алексей Анатольевич: Да, я понял вопрос. Видимо, речь идёт об экспериментах по термостабильности. Дело в том, что эти эксперименты, которые приведены в работе, и там это указано, они были сделаны на примере ренатурированного белка в растворе. И это, в общем-то, отличается от условий, в которых находится нативный белок, потому что он мембранный, тем более. И, вполне возможно, что, находясь в мембране, он гораздо стабильнее, потому что эксперименты по вот этой термостабильности, они делались таким образом, что перед реакцией в течение 10 минут при определённой температуре инкубируется фермент, а дальше ставилась реакция, и определялся уровень сигнала. Соответственно, фактически это эксперименты по определению термостабильности этого белка. Но, опять же, в растворе и в мембране белки ведут себя по-разному. Я думаю, что точный ответ на этот вопрос мы сможем получить, когда у нас будет структура. Сейчас над этим работают другие люди. Когда будет структура, мы сможем точно ответить на этот вопрос.

Иванов Вадим Тихонович: Александр Сергеевич, можно.

Арсеньев Александр Сергеевич: Да, очень интересная, даже детективная история, с интересом выслушал. Вопрос. Вы упомянули КД и ЯМР. И Вы упомянули рефолдинг. Вопрос первый. Когда Вы делали рефолдинг, вот водорастворимого домена, да? Какой процент вам удавалось рефолдировать? Могли это оценить по люминесценции?

Котлобай Алексей Анатольевич: Во время рефолдинга могу сказать, насколько я помню точно, мы не оценивали, но я помню, что количество осадка, который выпадает

при ренатурировании белка, в процессе рефолдинга, было не очень большое. Достаточно большой процент белка фолдировался. Что касается экспериментов, связанных с КД и ЯМР, их делал уже не я. Поэтому... И они в эту работу не входят. Но я знаю, что там пока результата какого-то нет. И пока только на пути к выяснению структуры.

Арсеньев Александр Сергеевич: Но Вы же могли, зная процент рефолдинга, просто делая это количественно, оценить процент рефолдинга. Потом этот образец могли отнести на КД и оценить хотя бы вторичную структуру. А далее...

Котлобай Алексей Анатольевич: Насколько я знаю, сейчас это сделано.

Арсеньев Александр Сергеевич: Секунду, закончу.

Котлобай Алексей Анатольевич: Простите.

Арсеньев Александр Сергеевич: А дальше Вы могли обратиться в Лабораторию того же Ефремова и попытаться смоделировать эту систему, структуру. Нет?

Котлобай Алексей Анатольевич: Насколько я знаю, сейчас данные КД уже есть. По крайней мере, процент альфа-спиралей и бета-слоев известен. Но, повторюсь, этой работой уже занимаюсь не я. Поэтому я знаю о полученных результатах, но, к сожалению, подробности этой работы я уже не знаю. Моя работа закончилась фактически на стадии рефолдинга. А вот всё, что дальше, разрешение структуры – этим я уже не занимался.

Арсеньев Александр Сергеевич: Рефолдинг – стадия была Ваша. Дальше разумная какая-то оценка процента рефолдинга.

Котлобай Алексей Анатольевич: Да, а дальше этот рефолдинг...

Арсеньев Александр Сергеевич: Значит, что такое по Вашим оценкам – это 30%, 10%, 70% удавалось рефолдировать?

Котлобай Алексей Анатольевич: Это мне надо смотреть точные проценты. Сейчас я не вспомню точную цифру. Но я помню, что она была достаточно значительная.

Иванов Вадим Тихонович: По графику можете оценить?

Котлобай Алексей Анатольевич: Я думаю, что 60-70% было.

Иванов Вадим Тихонович: Ответ на Ваш вопрос приблизительный. Александр Василевский.

Василевский Александр Александрович: Скажите, пожалуйста, зачем он мембранный? Я так понял, что и в микросомальную фракцию он из-за этого трансмембранного сегмента попадал у Вас? Ну действительно мембраны, зачем этот трансмембранный сегмент?

Котлобай Алексей Анатольевич: Почему этот белок мембранный, это вопрос, скорее, к эволюции, чем ко мне. Но так получилось, что белок, которым мы занимаемся, оказался мембранным. Возможно, это связано с тем, что таким образом проще регулировать, может быть, процесс билюминесценции грибов. Потому что, в принципе, для свечения много молекул не надо, и их можно, возможно, таким образом как-то кластеризовать на поверхности. Это, скорее, поле для спекуляций и предположений, почему оно так.

Василевский Александр Александрович: А это первая мембранная люцифера?

Котлобай Алексей Анатольевич: Первая ли это мембранная люцифера? Так вот сейчас навскидку вспоминаю, насколько я помню – да. Остальные были либо секретрируемыми. По крайней мере, все целентеразиновые люциферазы – они секретрируемые, кроме люциферазы Renilla. И остальные люциферазы тоже водорастворимые. У светлячков, у динофлагеллят. Да, наверное, это первая мембранная.

Арсеньев Александр Сергеевич: Ну, во-первых, называть мембранный как-то не очень здорово. Да? Лучше мембраносвязанный.

Котлобай Алексей Анатольевич: В данном случае даже, возможно, мембранассоциированный. Потому что некоторые программы указывают на то, что это не трансмембранный домен, а мембранассоциированный. Тут тоже пока мы знаем только, что это мембранассоциированный белок. Трансмембранный или нет – тоже пока я бы не стал уточнять.

Иванов Вадим Тихонович: Есть ли ещё вопросы?

Богданов Алексей Михайлович: Вопрос по поводу укороченных версий. Вы указали, что до минус 37 N-концевых аминокислот всё светится, а после 40 – не светится. А между 37 и 40 что происходит?

Котлобай Алексей Анатольевич: Честно говоря, если интересует вопрос именно 38-39, то просто в силу создания этих конструкций у меня шаг был в три аминокислоты. Поэтому, на самом деле, эта работа изначально была сделана для того, чтобы просто понять – поможет, не поможет. Изучать точно, сколько можно удалить, сколько можно оставить – такой задачи не стояло. Это, скорее, второго плана была задача. И поэтому сказать точно о 38-39 я не могу.

Богданов Алексей Михайлович: Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Искияли вопросы? А, нет, прошу.

Долгих Дмитрий Александрович: Скажите, пожалуйста, вот если сравнить Ваш белок с теми, которые описаны в литературе и достаточно многочисленны, есть ли какие-то характеристики, которые для него уникальны, которые позволяют предположить, что вот в этой области вот в связи с этими уникальными характеристиками он мог бы быть использован?

Котлобай Алексей Анатольевич: У этого белка достаточно характерный спектр биолюминесценции, у него максимум 520 нанометров, что, в принципе, отличает его от многих других белков. Но его главное преимущество заключается в том, что с его участием нам удалось создать автономную систему. Потому что до недавнего времени единственной автономной биолюминесцентной системой была биолюминесцентная система бактерий, которую можно было закодировать всю в один оперон. Но она имела очень ограниченное применение. Поскольку, несмотря на то, что её даже пытались оптимизировать для использования в эукариотических клетках, работала она там плохо. Люцифераза у бактерий представляет из себя димер. И люциферин при этом обладает определённой токсичностью для эукариотических клеток. Поэтому главное преимущество конкретно этой люциферазы я вижу именно в том, что это часть автономной системы, с помощью которой можно практически в перспективе практически любой эукариотический организм будет сделать светящимся. И с помощью этого можно будет анализировать большое количество различных процессов.

Долгих Дмитрий Александрович: Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Прошу.

Богданов Алексей Алексеевич (младший): Алексей Анатольевич, большое спасибо за доклад. Я сам приглашённый человек. Я просто хотел Вас спросить, Вы думаете, об энзимологии вот этой конкретной люциферазы? Лучше, может быть, её экспрессировать в клетках насекомых, что-нибудь более такое нативное? И второй вопрос. Известна, например, константа Михаэлиса для АТФ? Поскольку Вы упомянули,

что есть АТФ зависимые люциферазы и АТФ независимые, их преимущества в действии и тех и других. Что-нибудь известно о путях?

Котлобай Алексей Анатольевич: Что касается АТФ-зависимой люциферазы, то люцифераза светлячка с 60-х годов, когда она была открыта, до сих пор активно изучается. И там, по-моему, известно уже всё до мельчайших подробностей. И при желании можно найти какие угодно константы для различных систем с различными аналогами, в том числе, и люциферина. Поэтому, в принципе, да, константа для АТФ зависимых, наверное, известна. Что касается экспрессии, как Вы сказали, в более нативных условиях, то, с моей точки зрения, дрожжи к грибам ближе, чем насекомые. Поэтому экспрессия в дрожжах выглядит более предпочтительной, честно говоря, чем в клетках насекомых. Тем более, что для того, чтобы экспрессировать в клетках насекомых – это отдельная довольно большая работа. Кроме того в нашей лаборатории эта кухня, в общем-то, не поставлена. Это трудоёмкая просто затея при этом с не очень понятными перспективами - зачем. Пока, по крайней мере, на данном этапе.

Иванов Вадим Тихонович: Иссякли вопросы? Можете пока ненадолго отдохнуть. Переходим к заслушиванию отзывов. Вначале отзывы ведущей организации.

Лукьянов Сергей Анатольевич: А можно комментарий?

Иванов Вадим Тихонович: У нас будет дискуссия.

Уткин Юрий Николаевич:

(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).

Отзыв ведущей организации. Федеральное государственное учреждение «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии». По ходу отзыва рассматривается актуальность данной диссертационной работы. В первой части, в частности, говорится, что открытие этих ферментов позволит создать большое число различных биолюминесцентных методов для биологии и медицины, контекст которых постоянно расширяется за счёт получения новых мутантных форм с лучшими характеристиками. Разработанные инструменты используются для определения различных веществ с помощью клеток-репортеров, скрининга лекарственных препаратов, в том числе, и при подборе оптимальных условий проведения химиотерапии рака.

Подчёркивается, что существуют некоторые недостатки и ограничения. И 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 не подлежит никакому сомнению.

Далее рассматривается содержание диссертационной работы в частности то, что уже здесь было доложено. Поэтому позвольте мне опустить некоторые моменты и наиболее детально остановиться лишь на некоторых. В частности, глава «Обзор литературы» содержит 6 разделов, все они содержат краткое описание истории открытия, изучения, схемы. Также приводятся данные по структурам люцифераз в тех случаях, когда структура установлена. Есть некоторые замечания. 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.

Далее рассматривается глава «Материалы и методы», которая содержит подробное описание экспериментальных подходов, используемых в ходе выполнения работы. Глава

«Результаты и обсуждение» состоит из трёх разделов. Первый раздел посвящён улучшению очищенного препарата люциферазы из мицелия гриба, пригодного для масс-спектрометрического измерения. Во втором разделе описываются результаты поиска гена люциферазы с помощью методов молекулярной биологии. И далее детально анализируются те результаты, которые мы уже заслушивали. Однако после прочтения данного раздела возникает вопрос: почему не была разрешена структура изучаемого фермента, если разработана методика его ренатурации, позволяющая получить препарат белка, пригодный для исследования методом ЯМР или для получения кристалла. И завершая анализ диссертационной работы, 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 приёмов. Все полученные данные хорошо документированы, и их достоверность не вызывает сомнений. Сделанные в работе выводы вполне обоснованы и базируются на комплексном применении разных методов исследований. Высказанные замечания носят сугубо полемический характер, нисколько не снижая при этом общего прекрасного впечатления от проделанной автором работы. Полученные результаты оригинальные и отражены в 3 статьях, опубликованных в рецензируемых журналах, входящих в перечень изданий, рекомендованных Минобрнауки для публикации основных результатов диссертационных работ.

Материалы диссертационной работы 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 физики, Институте белка, Институте биохимии, Институте биофизики, 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», предъявляемых к работам, представляемым на соискание учёной степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03» - молекулярная биология, а её автор заслуживает присвоения искомой степени. Отзыв заслушан, обсуждён и утверждён на совместном научном семинаре Лаборатории структурной биохимии белка и группы белок-белковых взаимодействий Института биохимии им. Баха федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук. Мероприятие было 26 декабря 2018 года. Отзыв подписан заведующим Лабораторией структурной биохимии белка, доктором биологических наук, профессором Дмитрием Ивановичем Левицким. Утверждён директором федерального центра биотехнологий, член-корреспондентом Российской академии наук Поповым.

Иванов Вадим Тихонович: У нас здесь была пара вопросов-замечаний. Хотелось бы услышать Ваши комментарии, ответы.

Котлобай Алексей Анатольевич: По поводу структуры не буду повторяться, мы довольно много говорили в той части, которая была с вопросами ко мне. А по поводу замечаний к литобзору я могу сказать, что, во-первых, применение люцифераз – это очень

большая тема. И, скорее, на эту тему надо делать не обзор, а книгу писать. Кроме того, относительно недавно в нашей лаборатории защищалась работа, в литобзоре которой как раз... Он был посвящён именно применению люцифераз, поэтому мне не очень хотелось повторяться. Тем более, что по нынешним правилам работа проверяется через систему антиплагиата. И там были бы неминуемо повторения и совпадения. Но вместе с тем в моём литобзоре присутствуют ссылки на определённые работы и на некоторые обзоры, которые смогут при необходимости показать читателю весь круг проблематики, в которой используются люциферазы и люминесцентные методы исследований.

Иванов Вадим Тихонович: Всё у вас?

Котлобай Алексей Анатольевич: Да.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Дальше по процедуре защиты у нас научный руководитель. Если он имеет желание, он может охарактеризовать диссертанта. Есть у нас Илья Викторович?

Ямпольский Илья Викторович: Да. Уважаемые коллеги! Мне приятно – приятная обязанность: охарактеризовать Алексея. Как нам рассказал Юрий Николаевич, Алексей закончил кафедру молекулярной биологии биофака и после этого...

Иванов Вадим Тихонович: Мне казалось – биохимии.

Ямпольский Илья Викторович: Молекулярной биологии по специальности биохимия, но кафедра молекулярной биологии. И Лёша долгое время после этого работал в Лаборатории Сергея Анатольевича Лукьянова. И занимался похожим проектом – расшифровкой новой биолюминесцентной системы другого организма, такой, морской полихеты (*Chaetopterus*). По-русски называется морской дракон. Тогда не удалось расшифровать эту систему. Потом Алексей поработал какое-то время в лаборатории Мити Чудакова. И вот в 2015 году мы начали работать с Алексеем в нашей группе, потом в лаборатории. И вот Лёше и в этот раз досталась самая сложная задача из тех, которые у нас были на повестке дня в лаборатории – это поиск абсолютно нового фермента, про который ничего не известно. И мы занимались этим очень долго. Не получалось. Около 5 лет мы искали эту люциферазу. И вот Лёша был поставлен на самый такой прорывной фронт. И я очень рад, что он сумел сделать результат, который привёл, можно сказать, к прорыву в этой сфере. И теперь на основе того, что сделал Лёша, родилось около дюжины разных проектов. В том числе, создание биолюминесцентных растений, которые, я надеюсь, мы тоже скоро покажем с трибуны.

Иванов Вадим Тихонович: Ваша задача характеризовать диссертанта.

Ямпольский Илья Викторович: Да. Я хочу сказать, что это во многом Лёшина заслуга. Потому что от его прорывного результата вся эта прикладуха была бы невозможна. О личности Алексея я могу сказать, что он человек интересующийся. Всегда готов заниматься чем-то совсем новым. Для учёного, мне кажется, это важно. Кроме того, он амбициозен и критичен по отношению к себе и к другим. Всё это позволяет с большим оптимизмом смотреть на его будущую научную карьеру. Я надеюсь, что она будет продолжаться в нашем институте. И в заключение ещё хотел сказать, что то, что Лёша сегодня докладывал, это небольшая часть того, что он делает. За время работы над этой диссертацией он успел открыть ещё другую люциферазу, которая тоже не имеет гомологов. И тот проект, с которым он начинал работу в нашем институте – *Chaetopterus*, тоже близок к завершению не без Лёшиного непосредственного участия. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо. Имеем возможность перейти уже к официальным отзывам оппонентов. У нас два оппонента. Начнём с Татьяны Викторовны

Демидкиной. Профессор, Лаборатория химического биокатализа, Институт молекулярной биологии. Но поскольку её самой нет, то придётся с отзывом познакомить нашего помощника учёного секретаря.

Уткин Юрий Николаевич:

(Зачитывает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).

Отзыв официального оппонента к диссертационной работе. Актуальность диссертационной работы Алексея Анатольевича Котлобая определяется объектами исследования - в работе получен и охарактеризован новый фермент - Люцифера гриба и установлены нуклеотидные последовательности. Биолюминесценция, присущая люциферазам, широко применяется в биологических и медицинских исследованиях и для технологических анализов. Работа закладывает основы для изучения механизма действия люциферазы гриба, что внесёт вклад в фундаментальную энзимологию и расширяет список биолюминесцентных систем, используемых в практиках. Далее проводится детальный анализ содержания работы. Работа построена по традиционному плану. В главе первой «Обзор литературы» рассмотрены данные о люциферазах множества организмов. Для каждого организма и вида внутри него диссертант приводит таблицы, содержащие главную характеристику люциферазы.

Далее рассматривается основная часть. В работе поставлены 3 задачи: установить нуклеотидные последовательности генов люцифераз различных видов грибов, получить функциональную люциферазу грибов в гетерологической системе экспрессии. И третье – применить люциферазу грибов в практических приложениях, традиционных для люцифераз. Следует отметить, что первая задача диссертационной работы не являлась тривиальной, поскольку геномы различных видов грибов не секвенированы полностью. Поэтому для поиска и клонирования люциферазы гриба пришлось использовать два подхода. Дальше детально рассматриваются использованные подходы, что, собственно, уже заслушали в докладе диссертанта. И далее делается такой вывод. После установления аминокислотной последовательности люциферазы грибов Котлобай провёл её сравнение с известными для люцифераз из различных источников последовательностями.

Далее с восклицательным знаком. Примечательно, что поиск не обнаружил ни одного гомолога. То есть, среди известных на сегодня люцифераз люцифераза гриба является уникальным ферментом, что очень важно для фундаментальной энзимологии.

Далее идёт анализ следующих разделов диссертации, что мы заслушивали в докладе претендента. И делается следующее заключение. Все поставленные перед диссертационной работой задачи Котлобай успешно выполнил. Большой объём экспериментальной работы сделан с использованием современных методов различных дисциплин физико-химической биологии, таких как биоинформатика, генетическая инженерия, белковая химия, масс-спектрометрия. Полученные в работе результаты свидетельствуют о высоком теоретическом и экспериментальном уровне Котлобая. И вносят существенный вклад в развитие знаний о люциферазах, их эволюции и расширяет список ферментов, использующихся в различных областях науки и техники. Результаты диссертационной работы опубликованы в отечественных и международных журналах. В том числе, в журналах с высоким рейтингом и доложены на конференциях.

Диссертация написана хорошим языком. Практически не содержит англицизмов и хорошо иллюстрирована. Автореферат полностью отражает содержание диссертации. Результаты работы могут быть использованы в федеральных научных учреждениях науки - Институте теоретической и экспериментальной биофизики, Институте Белка, Институте биохимии.

Есть вместе с тем и некоторые замечания, относящиеся к оформлению работы.

- 1) люцифераза принадлежит к классу ферментов (стр. 6, написано «процесс катализируется белком»), поэтому в тексте (в разделе «Ведение») нужно указать классификацию фермента;
- 2) стр. 19 - следует писать «генетическая последовательность, кодирующая люциферазу»;
- 3) стр. 69, рис. 23 (А), на оси ординат, вероятно, приведено нормализованное поглощение;
- 4) стр. 84, из текста вначале не понятно, удалялись ли единичные остатки (6-ой, 9-ый и т.д.) или пептиды остатков 1-6, 1-9 и т.д.;
- 5) стр. 35, более корректно писать, что люцифераза вступает в реакцию с субстратом, а не наоборот;

б) стр. 82, рис. 35 - как упоминалось выше, в подписи уместно указать проценты идентичности и гомологии аминокислотных остатков и что означают цвета для остатков. Это все замечания. Далее. Диссертационная работа Котлобая по актуальности, научной новизне, теоретическому и методическому уровню, достоверности результатов полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении учёных степеней», предъявляемым к работам, представляемым на соискание учёной степени кандидатов наук. Алексей Анатольевич Котлобай, несомненно, заслуживает присвоение степени кандидата биологических наук по специальности «03.01.03» - молекулярная биология.

Официальный оппонент – главный научный сотрудник, исполняющий обязанности зав. Лабораторией химических основ биокатализа Института молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Татьяна Викторовна Демидкина.

Иванов Вадим Тихонович: Алексей Анатольевич, там была пара замечаний, прошу ответить.

Котлобай Алексей Анатольевич: В данном случае я соглашусь со всеми замечаниями оппонента.

Иванов Вадим Тихонович: Вы с ними согласны?

Котлобай Алексей Анатольевич: Да, я согласен.

Иванов Вадим Тихонович: Принимается. Облегчаете нашу задачу. Давайте заслушаем второй отзыв. Алексей Генрихович Катруха, кафедра биохимии, профессор, я имею в виду биофака.

Катруха Алексей Генрихович:

(Излагает отзыв, отзыв положительный, отзыв прилагается).

Уважаемые коллеги! Я хочу поблагодарить Алексея Анатольевича за возможность оппонировать его работу. Я с большим удовольствием прочитал и литературный обзор, и экспериментальную часть. И с большим удовольствием оппонировал работу, что, к сожалению, не так часто встречается в последнее время. Для выполнения диссертационной работы... Собственно выполнение диссертационной работы подразумевает выполнение нескольких основных задач. Прежде всего, автор должен ознакомиться с существующими знаниями в данной области. Освоить литературу, научную литературу с тем, чтобы хорошо ориентироваться в области исследования. И здесь я хочу сказать, что Алексей Анатольевич безусловно прекрасно справился с поставленной задачей. Литературный обзор написан хорошим, понятным языком. Описаны различные примеры биолюминесцентной системы, описаны представители

ферментов различных билюминесцентных систем. Описаны биохимические свойства. Видно, что автор хорошо владеет материалом.

Вторая задача подразумевает освоение различных методов, которые используются в данной области знаний. И, как было сказано в отзыве предыдущего оппонента, безусловно, здесь тоже Алексей Анатольевич справился с поставленной задачей. Работа выполнена на очень высоком техническом профессиональном уровне, используется масса различных методов. Самых широких методов, начиная от, как уже было сказано, биоинформационных методов, физико-химических методов, традиционных биохимических методов. Так что мы можем говорить, что автор свободно владеет тем инструментарием, который необходим для проведения современных научных исследований.

Безусловно, желательный, так скажем, результат проделанной работы – это небольшое открытие, которое должен совершить диссертант в процессе выполнения работы. Здесь тоже всё в порядке. Потому что автор описывает новую группу ферментов, исследовал строение этих ферментов, получил рекомбинантную форму, активную форму фермента и описал основные биохимические свойства этого фермента. И предложил подходы для использования этого фермента для решения каких-то биохимических задач. Так что можно говорить о том, что нам сегодня автор представил логичное, последовательное и чёткое исследование с хорошо сформулированными задачами и описанием того, как автор решил эти задачи.

Что касается критических замечаний, то у меня было несколько замечаний. Во-первых, я уже говорил, что литературный обзор очень хорошо написан, хорошим понятным языком, но почему-то, по какой-то причине в литературном обзоре автор совершенно не обсуждает ту группу организмов, грибы и билюминесцентные системы грибов. Собственно то, чем он занимался.

Второе замечание касается биохимических исследований. Это, скорее, не замечание, а вопрос, касается биохимических исследований объекта. Автор показывает в своей работе в экспериментах *in vitro*, что активность описываемого фермента зависит от температуры, что неудивительно. Показывает, что температурный оптимум этого фермента находится в районе 10-20°C, а при температуре 34-38°C фермент практически полностью теряет свою активность. Однако потом в работе описывается эксперимент, проведённый *in vivo*. Мы видим, что фермент прекрасно работает при температуре 37-38°C в живых организмах и, прежде всего, в культурах. И, к сожалению, автор никак не обсуждает это интересное наблюдение в своей работе. И, в целом, общее такое замечание к разделу «Результаты и методы». Очень подробно и хорошо описаны результаты, воспроизводимо так, как оно и должно быть в диссертационной работе. Однако вот раздел «обсуждения» страдает лаконичностью. И я бы высказал пожелание в следующий раз в подобных работах автору быть более подробным и посвятить больше внимания и времени на обсуждение полученных результатов и сравнительного анализа с другими исследованиями. И так далее.

И традиционное заключительное слово. Я хочу сказать, что высказанные замечания и комментарии ни в коей мере не нарушают безусловных достоинств, представленных в диссертационной работе. Исследования Алексея Анатольевича посвящены интересной и актуальной проблеме. Выполнены на высоком методическом уровне. И содержат целый ряд новых, оригинальных данных, фактов для понимания строения и функционирования большой группы ферментов, впервые описанных в диссертационной работе. По своему

объёму, оформлению и качеству полученных данных диссертационная работа Алексея Анатольевича соответствует критериям, предъявляемым к работам, представленным на соискание учёной степени кандидат биологических наук по специальности «молекулярная биология». Её автор заслуживает присвоения искомой степени. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо, Алексей Генрихович. Наверное, ответ на замечания.

Котлобай Алексей Анатольевич: Я, в принципе, согласен с замечаниями оппонента. Что касается вопроса, который прозвучал от коллеги, мне кажется, я на него уже ответил подробно, потому что практически такой же вопрос задавала и Татьяна Владимировна. Единственное, что, я думаю, что, правда, мне стоило как-то сакцентировать внимание на этом моменте более подробно в тексте. Описать причины некоторого различия поведения фермента в разных экспериментах. Что касается литературного обзора, то, да, пожалуй, мне стоило включить отдельную главу о биоллюминесцентной системе грибов. Но на тот момент мне не казалось это необходимым, поскольку обзор мой посвящён, в первую очередь, люциферазам из различных биоллюминесцентных систем, а, собственно, люцифераза из грибов как раз описана не была. Поэтому я не включил этот раздел, но я думаю, что оппонент прав и, скорее всего, надо было включить небольшую главу по этому вопросу. Мне кажется, я на все замечания ответил.

Иванов Вадим Тихонович: Правда, здесь оппонент сказал, что в следующий раз пусть диссертант учтёт. Я думаю, следующего раза не будет. Потому что мы сейчас проголосуем. Спасибо. Мы услышали все заготовленные отзывы. Можем перейти к дискуссии. По-моему, Сергей Анатольевич хотел нам что-то такое сказать.

Лукиянов Сергей Анатольевич: Спасибо. Уважаемый Вадим Тихонович, уважаемые коллеги! Мне хотелось бы отметить, что работа, которая представлена сегодня, это такой центральный фрагмент, но всё-таки ядро очень большого и очень успешного проекта в области расшифровки биоллюминесцентных систем. И хотя несколько систем ранее были уже расшифрованы, такие наиболее простые, потом в этом направлении наука как-то стала буксовать. И на десятки лет, десятки лет никому не удавалось расшифровку провести. Это не удавалось и академику Гительзону, с которым мы активно сотрудничали. И это он мне говорил, что мечтой всей его жизни была расшифровка биоллюминесценции грибов. И Нобелевскому лауреату Осаму Шимомуре, который также принял участие в этом проекте. И который написал мне письмо, где признал, что на сегодняшний момент в области биоллюминесценции равных коллективу, который собран в биоорганической химии, не существует. Вот это огромное количество авторов из разных лабораторий по всему миру (Бразилия, Япония, Красноярск и прочее), по сути, координируются из нашего института. И ещё один момент – это вот, Вадим Тихонович, классическое такое воплощение мечты биоорганической химии, когда от структуры выходят на белок, от белка на геном, от генома на кластер генов. И полная расшифровка всей цепочки преобразований, которые происходят в работе системы. Это очень красивая работа. Алексей сделал центральную её часть. Подходили мы к биоллюминесценции ещё 10-15 лет назад, и у нас не получалось. А это успех, который открыл новую площадку и теперь и в области флуоресцентных белков, и в области биоллюминесценции наш институт самый сильный в мире, пожалуй. Поэтому я призываю поддержать Алексея позитивным голосованием по работе. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Идея понятна. Спасибо. Есть ещё какие-то мнения по поводу голосования? Рекомендательные, поддерживающие. Пожалуйста.

Габибов Александр Габибович: Я выступаю ещё в связи с тем, что Татьяна Викторовна Демидкина не смогла, у неё какие-то проблемы с ногой случились три дня назад. Она не смогла прийти, но дала отзыв. И она мне позвонила, вчера мы с ней разговаривали. Она подчеркнула, что ей очень понравилась эта диссертация. Это очень ценно, потому что Татьяна Викторовна возглавляет Лабораторию Александра Евсеевича. И я думаю, что не только вот перечисленные Сергеем Анатольевичем люди, учёные крупные в области свечения, а классики энзимологии были бы очень рады. Вообще всегда открытие нового фермента – это было событие. Сейчас, может быть, это видится как предмет кандидатской диссертацией. Таким образом, я передаю ещё лично слова Татьяны Викторовны, я думаю, что она позвонит, поздравит, но что мне хотелось бы особенно здесь подчеркнуть? Действительно, по энзимологии можно придирается к каким-то аспектам и в моих вопросах и здесь звучавших, но здесь было сделано главное. Алексей сумел действительно сделать такой таргетный фишинг. То есть, вытащить из цепи важное звено, на котором удалось сформировать то, что сейчас принято называть синтетической биологией. И то, что сказал Сергей Анатольевич здесь, действительно эта работа стала основополагающей для действительно нового направления биоорганической химии. Я бы сказал обновлённого. Потому что химическая суть известна, но это очень важно. Я хочу сказать, что мы общаемся, мы работаем. Мои сотрудники, отдельно отделившиеся лаборатории, и другие активно сотрудничают. И очень приятно, что в институте есть такая группа, в составе вновь созданного отдела биомолекулярной химии, руководимого Ильёй Викторовичем. И это очень такой растущий элемент. Я призываю всех голосовать «за». И ещё раз подчёркиваю, вот лейтмотив моего выступления, что открытие нового фермента здесь явилось точкой роста действительно нового направления биоорганической химии. Я надеюсь, что голосование будет хорошее. Я сразу объединяю своё поздравление с призывом голосовать «за». Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Есть ещё? Да, прошу.

Кирсанов Кирилл Игоревич: Добрый день, глубокоуважаемые члены диссертационного совета! Уважаемые коллеги! Меня зовут Кирсанов Кирилл Игоревич. Я заведующий Лабораторией канцерогенных веществ из онкологического центра Блохина. Я хотел поблагодарить Алексея Анатольевича за прекрасный доклад. Редко удаётся в доклад вернуть не одну, а две или три интриги такие научные. Было очень интересно слушать. Спасибо. Переходя к сути работы, я хотел бы сказать, современная экспериментальная онкология имеет два очень важных вектора. Первый вектор направлен на визуализацию всех процессов, которые происходят в клетке или в организме. И второй вектор – это на сокращение животных, которые используются в экспериментах. И, соответственно, все эти оба вектора сходятся именно в разработке новых методов для визуализации на уровне клетки, на уровне организма. И поэтому я хотел бы подчеркнуть значимость работы Алексея Анатольевича не только в плане фундаментальной значимости в плане молекулярной биологии, но и междисциплинарный характер, такую вот практическую значимость работы. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо Вам. Есть ещё добавочные аргументы? По-видимому, всё ясно. За сим мы дискуссию завершаем. И должны перейти уже к принятию решения. Для этого нам нужно проводить тайное голосование. Для этого нужно избрать счётную комиссию. И, я так понимаю, уже какие-то предложения сформированы? Я

зачитываю без регалий и без имён, отчеств. Долгих, Патрушев, Уткин. Предварительное согласие от них было получено. Есть возражения против данного состава счётной комиссии? Отводы, самоотводы. Я считаю, что мы утвердили счётную комиссию. Перед тем, как объявлять перерыв, ещё два пункта. Первое. Я должен дать заключительное слово диссертанту перед тем, как голосовать. Прошу.

Котлобай Алексей Анатольевич: Традиционно заключительное слово используется для того, чтобы выразить благодарность всем, кто участвовал в работе, помогал мне. Но начать я хотел бы с благодарности не тем, кто помогал мне именно в работе, а с благодарности моим оппонентам, которые взяли на себя труд прочесть всю мою диссертацию от начала до конца и более того, составить критический отзыв на неё. Также хотел бы поблагодарить своего научного руководителя, не последним из достоинств которого являлся тот факт, что он всегда предоставляет полную свободу действий, и это существенно ускоряет получение нужных результатов. Как я уже говорил, любое современное научное исследование, хорошее исследование, это, как правило, плод труда целого научного коллектива. Потому что требует участия специалистов из разных областей, зачастую из разных лабораторий. Иногда раскиданных по разным частям мира. И в данном исследовании мне бы хотелось в первую очередь поблагодарить Юлиану Мокрушину и Ивана Смирнова, которые на момент выполнения работы были сотрудниками лаборатории биокатализа, возглавляемой Александром Габибовичем. Сейчас Иван Витальевич уже зам. директора, у него уже своя лаборатория. Но, тем не менее, они внесли воистину неоценимый вклад в эту работу, особенно в той части, которая касалась работы с клетками дрожжей.

Также хотелось бы поблагодарить Фёдора Ерошкина, сотрудника лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза нашего института, при чьём непосредственном участии были получены трансгенные эмбрионы шпорцевой лягушки.

Отдельную благодарность хотел бы выразить Александру Мишину, который на момент выполнения работы был сотрудником лаборатории биофотоники. Сейчас у него тоже своя группа уже. Его опыт и знания оказались очень полезными в экспериментах, связанных с микроскопией. Также стоит отметить, что данная работа выполнялась в те времена, когда в нашем институте ещё не было собственного биоимаджера Айвис. Поэтому я хотел бы поблагодарить Максима Абакумова из Медицинского университета имени Пирогова, благодаря которому мы смогли проводить у них на их приборе эти эксперименты, получить изображения, без которых вряд ли мы бы смогли сделать эту работу.

И в заключение хотелось бы поблагодарить многочисленных сотрудников нашей лаборатории - Лаборатории химии метаболических путей, многие из которых, вольно, а кто-то невольно, оказался вовлечён в этот проект и принял в нём участие. Спасибо.

Иванов Вадим Тихонович: Спасибо Вам. Обычно перед голосованием мы обсуждаем проект заключения, который готовится к началу работы будущего совета и с тем, чтобы потом упростить процедуру голосования, которая следует за утверждением протокола подсчёта голосов. Есть какие-то замечания по поводу проекта? Есть замечания, есть какие-то ошибки грамматические, я просто предлагаю, что я обсужу их с авторами этого проекта. И мы примем удовлетворяющее обе стороны заключение. Просто ошибки надо исправить, они очевидные. И при этом условии я от других замечаний не видел. Есть ли замечания по поводу проекта заключения. Бовина нет, поэтому мне не видно, кто бы ещё корректировал этот проект. Тогда мы подготовим к голосованию, объявляю короткий

перерыв на голосование. Надеюсь, он будет недолгий. Поэтому прошу не расходиться. Подсчёт не обещает быть долгим.

(Проводится тайное голосование)

Уткин Юрий Николаевич: Протокол заседания счётной комиссии. Присутствовало на заседании 21 член учёного совета. Роздано бюллетеней 21. Оказалось неиспользованных бюллетеней 9. Оказалось в урне бюллетеней 21. Результаты голосования: «за» 21, против – нет, недействительных нет.

Иванов Вадим Тихонович: Не удивительно. Но мы еще должны утвердить итоги голосования. Кто против? А теперь можем аплодировать. Ещё есть возражения против утверждения протокола заключения по поводу диссертации? Мы договаривались, что мы обсудили и возражений не будет. Нет возражений?

(Далее проходит голосование по проекту заключения диссертационного совета. Проект заключения принимается единогласно.)

Иванов Вадим Тихонович: Утвердили заключение. Спасибо за работу. Сегодня мы в рекордные сроки. Получилось за полтора часа, сделали хорошую работу. Всего доброго! До встречи.

Председатель
диссертационного совета

И.О. ученого секретаря
диссертационного совета



академик РАН Иванов В.Т.

д.х.н. Уткин Ю.Н.