

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА Д 002.019.01,

созданного на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, по диссертации на соискание ученой степени кандидата наук

аттестационное дело № _____

решение диссертационного совета от 20 марта 2019 № 5

О присуждении **Котлобай Алексею Анатольевичу**, гражданину Российской Федерации, ученой степени кандидата биологических наук.

Диссертация «Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы грибов» по специальности 03.01.03 (молекулярная биология) принята к защите 19 декабря 2018 г., протокол №17 диссертационным советом Д 002.019.01, созданным на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, (117997, Москва, ГСП-7, ул. Миклухо-Маклая, д. 16/10), действующим на основании Приказа Минобрнауки России № 75/нк от 15 февраля 2013 года.

Соискатель Котлобай Алексей Анатольевич 1984 года рождения, в 2007 году окончил Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего профессионального образования Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова по специальности "Биохимия".

С 2007 года по 2010 гг. обучался в аспирантуре Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук (ИБХ РАН). В настоящее время работает в должности младшего научного сотрудника в лаборатории химии метаболических путей ИБХ РАН. Диссертация выполнена в лаборатории химии метаболических путей ИБХ РАН.

Научный руководитель - доктор химических наук Ямпольский Илья Викторович, заведующий отделом биомолекулярной химии Федерального государственного бюджетного учреждения науки Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук.

Официальные оппоненты:

Демидкина Татьяна Викторовна - доктор химических наук, профессор, главный научный сотрудник, и.о. заведующего лабораторией химических основ биокатализа ФГБУН Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Катруха Алексей Генрихович - доктор биологических наук, профессор, ведущий научный сотрудник кафедры биохимии биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

дали положительные отзывы на диссертацию.

Ведущая организация ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», в своем положительном отзыве, подписанном д.б.н., профессором Левицким Дмитрием Ивановичем, заведующим лабораторией структурной биохимии белка, утвержденном чл.-корр. РАН Поповым Владимиром Олеговичем, директором ФГУ «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук», отметила, что работа представляет собой полноценное завершенное научное исследование, выполненное на высоком современном экспериментальном уровне, а 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, и указала, что диссертационная работа Котлобай Алексея Анатольевича соответствует критериям, установленным "Положением о присуждении ученых степеней", (утверждено Постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 г. № 842), а сам диссертант заслуживает присвоения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 - Молекулярная биология.

Соискатель имеет 15 опубликованных работ, в том числе по теме диссертации опубликовано 3 работы общим объемом 1 печатный лист в рецензируемых научных изданиях, входящих в базы данных Web of Science и Scopus. В

диссертации отсутствуют недостоверные сведения об опубликованных соискателем ученой степени работах. Научные работы по теме диссертации, в которые А.А. Котлобай внес основной либо существенный вклад:

1. **Kotlobay A.A.**, Sarkisyan K.S., Mokrushina Y.A., Marcet-Houben M., Serebrovskaya E.O., Markina N.M., Somermeyer L.G., Gorokhovatsky A.Y., Vvedensky A., Purtov K.V., Petushkov V.N., Rodionova N.S., Chepurnyh T.V., Fakhranurova L.I., Guglya E.B., Ziganshin R., Tsarkova A.S., Kaskova Z.M., Shender V., Abakumov M., Abakumova T.O., Povolotskaya I.S., Eroshkin F.M., Zarskiy A.G., Mishin A.S., Dolgov S.V., Mitiouchkina T.Y., Kopantzev Y.P., Waldenmaier H.E., Oliveira A.G., Oba Y., Barsova E., Bogdanova E.A., Gabaldón T., Stevani C.V., Lukyanov S.A., Smirnov I.V., Gitelson J.I., Kondrashov F.A., Yampolsky I.V. Genetically encodable bioluminescent system from fungi. // PNAS 2018, v. 115, N 50, p. 12728-12732

2. Kaskova Z.M., Dörr F.A., Petushkov V.N., Purtov K.V., Tsarkova A.S., Rodionova N.S., Mineev K.S., Guglya E.B., **Kotlobay A.**, Baleeva N.S., Baranov M.S., Arseniev A.S., Gitelson J.I., Lukyanov S., Suzuki Y., Kanie S., Pinto E., Di Mascio P., Waldenmaier H.E., Pereira T.A., Carvalho R.P., Oliveira A.G., Oba Y., Bastos E.L., Stevani C.V., Yampolsky I.V. Mechanism and color modulation of fungal bioluminescence. // Sci Adv. 2017, 3(4):e1602847.

3. Пуртов К.В., Гороховатский А.Ю., **Котлобай А.А.**, Осипова З.М., Петушков В.Н., Родионова Н.С., Царькова А.С., Чепурных Т.В., Ямпольский И.В., Гительзон И.И. Люцифераза гриба *Neonothopanus nambi*: выделение и очистка. // Доклады академии наук, 2018, том 480, № 6, с. 747–750

На диссертацию поступили отзывы:

Отзыв официального оппонента д.х.н., проф., Демидкиной Татьяны Викторовны. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). Люцифераза принадлежит к классу ферментов (стр. 6, написано «процесс катализируется белком»), поэтому в тексте (в разделе «Введение») нужно указать КФ 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. 6). Стр. 82, рис. 35 – как упоминалось выше, в подписи уместно указать проценты идентичности и гомологи аминокислотных остатков и что означают цвета для остатков.

Отзыв официального оппонента д.б.н., проф., Катрухи Алексея Генриховича. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). Литературный обзор не содержит никаких данных об основном объекте

исследований – биоллюминесцентной системе грибов. 2). Список сокращений, использованных в работе, не полон и организован не оптимальным образом. Логично было бы разделить англо- и русскоязычные сокращения и расположить их в алфавитном порядке. 3). К одному из наиболее значимых достижений автора можно отнести проведение предварительных исследований биохимических свойств люциферазы *N. nambi*. Однако, в работе автор ограничивается только описанием полученных данных, не проводя сравнительного анализа исследуемого белка с гомологичными белками из других видов многоклеточных и одноклеточных организмов. 4). 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. 5). 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.

Отзыв ведущей организации. Отзыв положительный, содержит следующие замечания:

1). Возможно, в главе «Обзор литературы» 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.

2). 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?

Выбор официальных оппонентов и представителей ведущей организации обосновывается их научными достижениями в областях, связанных с исследованиями функционирования и структуры белков, а также ферментативного

катализа, которые подтверждены сериями их публикаций в ведущих научных российских и международных журналах. Высокая квалификация, большой опыт исследовательской и экспертной работы оппонентов и представителей ведущей организации позволяет им объективно оценить степень научной новизны результатов диссертационной работы, ее теоретическую и практическую значимость.

Диссертационный совет отмечает, что на основании выполненных соискателем исследований были установлены нуклеотидные последовательности генов люцифераз 8 видов люминесцентных грибов. Данные гены были клонированы и впервые осуществлена их гетерологическая экспрессия в клетках бактерий, дрожжей и млекопитающих, а также успешное применение в практических приложениях. Кроме того были впервые получены, клонированы и экспрессированы функциональные укороченные варианты люциферазы гриба *Neonothopanus nambi*.

Теоретическая значимость исследования обоснована тем, что в результате исследования было найдено новое семейство белков – люциферазы грибов, включающее в себя ферменты с принципиально новым, судя по полученным данным, и ранее не изученным, механизмом катализа.

Значение полученных соискателем результатов исследования для практики состоит в том, что люцифераза грибов была успешно применена для люминесцентного мечения как отдельных клеток, так и клеток внутри целого организма (мышь, эмбрионы шпорцевой лягушки). В свою очередь эти результаты подтверждают возможность создания новых, перспективных, биолюминесцентных инструментов для биологии и медицины на основе люциферазы грибов, применяемых в области биоимаджинга, исследований белок-белковых взаимодействий и изучения эффективности новых лекарственных препаратов.

Оценка достоверности результатов исследования выявила, что экспериментальные данные получены с использованием сертифицированного оборудования, приведены данные калибровок, показана воспроизводимость результатов в различных условиях. Данные получены альтернативными методами в независимых экспериментах и не противоречат друг другу.

Личный вклад соискателя состоит в непосредственном участии в планировании, выполнении и анализе результатов экспериментов. Все экспериментальные данные получены автором лично, за исключением следующих: работы по регистрации изображений с помощью системы IVIS Spectrum СТ проводились совместно с Абакумовым М.А. (н.с) из отдела медицинских нанобиотехнологий ФГБОУ РНИМУ им. Пирогова. Результаты масс-спектрометрических исследований были получены совместно с Зиганшиным Р.Х. (с.н.с лаборатории протеомики ИБХ РАН). Эксперименты с культурами клеток дрожжей проводились совместно со Смирновым И.В (зав.лаб. лаборатории химии протеолитических ферментов ИБХ РАН) и Мокрушиной Ю.А. (м.н.с лаборатории биокатализа ИБХ РАН). Инъецированные и трансгенные эмбрионы *Xenopus laevis* были получены при участии Ерощкина Ф.М. (с.н.с лаборатории молекулярных основ эмбриогенеза ИБХ РАН). Автор лично представлял результаты работы на международных конференциях, принимал активное участие в подготовке и продвижении научных публикаций.

На заседании 20 марта 2019 диссертационный совет принял решение присудить Котлобай Алексею. Анатольевичу ученую степень кандидата биологических наук.

При проведении тайного голосования диссертационный совет в количестве 21 человека, из них 5 докторов наук (по специальности рассматриваемой диссертации 03.01.03 - молекулярная биология), участвовавших в заседании, из 30 человек, входящих в состав совета, проголосовали: за 21, против 0, недействительных бюллетеней 0.

Председатель
диссертационного совета

И.О. ученого секретаря
диссертационного совета



академик РАН Иванов В.Т.

д.х.н. Уткин Ю.Н.