

ОТЗЫВ

официального оппонента о диссертационной работе

Алексея Анатольевича Котлобая

«Поиск, клонирование и экспрессия гена люциферазы»,

представленной на соискание ученой степени

кандидата биологических наук по специальности

03.01.03 – молекулярная биология.

Актуальность диссертационной работы Алексея Анатольевича Котлобая определяется объектами исследования – в работе получен и охарактеризован новый фермент - люцифера гриба *Neonothopanus nambi* и установлены нуклеотидные последовательности генов люцифераз люминесцентных грибов видов *Neonothopanus nambi*, *Armillaria gallica*, *Armillaria mellea*, *Armillaria ostoyae*, *Mycena chlorophos*, *Omphalotus olearius*, *Panellus stipticus* и *Mycena citricolor*. Биолюминесценция, присущая люциферазам, широко применяется в биологических и медицинских исследованиях и для технологических анализов. Работа закладывает основы для изучения механизма действия люциферазы гриба *Neonothopanus nambi*, что внесет вклад в фундаментальную энзиологию и расширяет список биолюминесцентных систем, используемых в практике.

Работа написана по традиционному плану. В главе I «Обзор литературы» рассмотрены данные о люциферазах множества организмов. Для каждого организма и видов внутри него диссертант приводит таблицы, содержащие главную характеристику люциферазы - длину волны излучения и источник информации. В тексте подробно приводятся известные для люцифераз биохимические характеристики и пространственные структуры. Поскольку важными характеристиками фермента является термостабильность и pH-зависимость ферментативной реакции, в качестве пожелания к этой части диссертации (возможно, Обзор будет опубликован) для люцифераз, наиболее широко применяемых в биологии, медицине, уместно было бы привести, наряду с максимумом люминесценции, эти характеристики.

В работе были поставлены три задачи:

- 1) Установить нуклеотидную последовательность генов люцифераз различных видов грибов.
- 2) Получить функциональную люциферазу грибов в гетерологической системе экспрессии.

3) 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 *N. nambi* пришлось использовать два подхода.

Биохимический подход (глава III, разделы 3.1- 3.1.5 диссертации) состоял в выделении и очистке люциферазы из биомассы гриба *N. nambi* для установления аминокислотной последовательности фермента методом масс-спектрометрического секвенирования. Экспериментальная работа для получения гомогенного препарата люциферазы была трудоемкой и сложной, начиная с самого первого этапа. Так, А.А. Котлобаю пришлось подбирать условия разрушения клеток гриба. Дальнейшая работа по выделению и очистке гомогенного препарата во многом осложнялась тем, что активность фермента находилась в микросомальной фракции лизата. В результате испытания нескольких детергентов и подбора условий соллюбилизации микросомальной фракции для дальнейших исследований была выбрана соллюбилизация с использованием додецилмальтозида. Для очистки фермента далее были использованы ионообменная хроматография и гель-фильтрация с контролем фракций гель-электрофорезом и определением люминесценции во фракциях. Масс-спектрометрический анализ полосы фермента, идентифицированной и накопленной многократным двумерным электрофорезом позволил провести поиск кандидатов гена люциферазы в транскриптом *N. nambi*. Поиск привел к 12-ти нуклеотидным последовательностям - кандидатам, которые были клонированы в клетки *Escherichia coli*. Но клон, содержащего активность фермента, идентифицировать не удалось. Дальнейшая работа по получению библиотеки кДНК гриба позволила выяснить причину отсутствия активности при экспрессии люциферазы в клетках *E. coli*.

Для поиска и клонирования гена люциферазы гриба *N. nambi* затем был применен традиционный подход молекулярной биологии: выделение РНК из биомассы мицелия для получения библиотеки кДНК с последующим ее клонированием в клетки дрожжей и поиском клон, содержащего ген люциферазы (глава III, разделы 3.2.1 – 3.2.8 диссертации). Для колоний анализировали свечение, из тех, в которых оно присутствовало, выделяли и секвенировали ДНК. Эта работа успешно завершилась установлением последовательности гена и аминокислотной последовательности люциферазы из *N. nambi*. Для создания штамма-продуцента люциферазы в клетках дрожжей ген фермента амплифицировали и клонировали в экспрессионный вектор в одну

рамку считывания с последовательностью, кодирующей С-концевой полигистидиновый фрагмент. Спектр люминесценции микросомальной фракции, который совпал со спектром мицелия *N. nambi*, подтвердил правильность клонирования. После установления аминокислотной последовательности гена люциферазы грибов А.А. Котлобай провел ее сравнение с известными для люцифераз из различных источников последовательностями. Примечательно, что поиск не обнаружил ни одного гомолога! Т.е., среди известных на сегодня люцифераз люцифераза гриба *N. nambi* является уникальным ферментом, что очень важно для фундаментальной энзимологии.

В разделе 3.2.5 описан поиск гомологов люциферазы *N. nambi* в геномах грибов и поиск гомологичных аминокислотных последовательностей, используя методы биоинформатики. Множественное выравнивание 45-ти найденных аминокислотных последовательностей (рис. 35, стр. 82) выявило высокую степень их гомологии. Семь нуклеотидных последовательностей – предполагаемые гены люциферазы различных видов грибов были синтезированы, оптимизированы для экспрессии в клетках млекопитающих и проверена их способность экспрессировать люциферазу в клетках HEK293NT и HeLa. Свечение трансфецированных клеток подтвердило наличие гена люциферазы у различных видов грибов.

В разделе 3.2.6 описано получение фрагментов рекомбинантного фермента при их экспрессии в клетках *E. coli*, поскольку получить приемлемую экспрессию полноразмерного гена фермента не удалось. Это, как было предположено на основании анализа аминокислотной последовательности люциферазы, могло быть следствием наличия трансмембранного домена из 40 аминокислот на N-конце полипептидной цепи фермента. Диссертантом были получены 11 укороченных вариантов люциферазы (было удалено от 6-ти до 37-и аминокислот на N-конце полипептидной цепи) и для них проверена способность катализировать реакцию окисления люциферина. Все фрагменты были активны. Анализ лизатов при экспрессии укороченных вариантов гена в клетках BL21-CodonPlus показал, что искомым белок с удаленным 37-членным фрагментом находится как в растворимой фракции лизата, так и в тельцах включения, причем большая часть находится именно в тельцах включения. Это потребовало разработки метода ренатурации фермента. С весьма сложной проблемой получения активных рекомбинантных ферментов из телец включения сталкиваются многие исследователи. Диссертанту удалось получить активный растворимый препарат, для которого был установлен рН-оптимум активности и проверена температурная стабильность.

В разделе 3.3 (глава III диссертации) приведены примеры применения рекомбинантной люциферазы *N. nambi*. А.А. Котлобай показал, что экспрессия гена

фермента возможна в клетках человека и она не приводит к их гибели. Мечение клеток внутри целого организма было продемонстрировано для мыши и эмбриона лягушки *Xenopus laevis*. При инъекции клеток карциномы *Mus musculus*, экспрессирующих люциферазу, в мышь эффективность люминесценции люциферазы *N. nambi* была сравнима с эффективностью люминесценции люциферазы светлячка. В случае эмбрионов лягушки *Xenopus laevis* мРНК люциферазы *N. nambi* инъекцировали в эмбрионы. Следует отметить, что для получения нужных для этих экспериментов конструкций проведена большая экспериментальная работа для каждого из объектов.

Все поставленные для диссертационной работы задачи А.А. Котлобай успешно выполнил. Большой объем 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 уровнях А.А. Котлобая и вносят существенный вклад в развитие знаний о люциферазах, их эволюции и расширяют список ферментов, используемых в различных областях науки и техники. Результаты диссертационной работы опубликованы в отечественных и международных журналах, в том числе 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 РАН, Институте Белка РАН, Институте биохимии имени А.Н. Баха Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН и других.

Некоторые замечания, относящиеся к оформлению работы:

- 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.

Диссертационная работа А.А. Котолобая по актуальности, научной новизне, теоретическому и методическому уровням, достоверности результатов полностью соответствует критериям, установленным «Положением о присуждении ученых степеней», (утвержденным Постановлением Правительства РФ от 21.04. 2016 г., № 335 02.08.2016 г., № 748, 29.05, 2017 г., № 650), предъявляемым к работам, представляемым на соискание ученой степени кандидата наук.

А.А. Котолобай, несомненно заслуживает присвоения степени кандидата биологических наук по специальности 03.01.03 «Молекулярная биология».

Официальный оппонент

главный научный сотрудник, и.о. зав. лабораторией химических основ биокатализа

Федерального государственного бюджетного учреждения науки

Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта

Российской академии наук (ИМБ РАН),

доктор химических наук, профессор

Татьяна Викторовна Демидкина

119991, г. Москва, ул. Вавилова, д. 32. ФГУБУН ИМБ РАН

Тел. 7 (499) 1359858, E-mail: tvd@eimb.ru

Подпись проф., д.х.н. Т.В. Демидкиной

«Удостоверяю»

Ученый секретарь ФГБУН ИМБ РАН

к.в.н. А.А. Бочаров

