

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Михаила Олеговича Агафонова  
«Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolyomorpha*:  
молекулярно-генетическая модель для изучения секреции белков и гомеостаза  
ионов кальция»,  
представленную на соискание ученой степени доктора биологических наук по  
специальности 1.5.4. Биохимия.

Проблема гетерологической экспрессии белковых генов человека в низших эукариотах – одна из важнейших проблем современной биотехнологии. Белки человека являются основой множества фармацевтических препаратов, и одним из самых удобных в теории способов получения таких белков является их синтез (с последующей секрецией во внеклеточную среду, чтобы избежать долгих и трудоемких процессов очистки) в организмах, позволяющих наращивать большую биомассу. Традиционно для этой цели используются дрожжи. Однако успешных примеров наработки и секреции белков человека в дрожжах в больших количествах к настоящему моменту известно не так много. Не в последнюю очередь это связано с существенными различиями в механизмах секреции белков в клетках дрожжей и человека. Даже хорошо секретлируемый в клетках человека белок не будет успешно секретироваться в клетках дрожжей.

Диссертационная работа Михаила Олеговича Агафонова направлена на описание фундаментальных механизмов секреции белков у двух видов дрожжей рода *Ogataea* (ранее известного как *Hansenula*). При этом основным объектом исследований был человеческий секретлируемый активатор плазминогена урокиназного типа (uPA), в норме слабо секретлирующийся из клеток дрожжей. Целью работы был поиск модификаций дрожжевой системы секреции, которые бы повышали эффективность секреции uPA. Такие модификации вследствие вышеизложенных причин имеют важнейшее прикладное значение; при этом ранее никто из исследователей не использовал такой подход для исследования тонких механизмов секреции. Таким образом, следует признать, что диссертационная работа Михаила Олеговича обладает высокой значимостью и актуальностью, причем как в фундаментальном, так и в практическом смысле.

Работа построена по стандартному плану и содержит все принятые в работах подобного рода разделы. Работа изложена на 244 страницах и содержит 10 таблиц, 69 иллюстраций и 492 источника в списке цитированной литературы.

Работа Михаила Олеговича начинается с раздела «Список сокращений», о котором обычно в отзывах писать нечего. Однако здесь он заслуживает внимания, поскольку в нем Михаил Олегович не только привел расшифровки употребляемых им в тексте сокращений, но и подробно описал используемую им генетическую номенклатуру. В данном случае это было крайне важно и уместно, поскольку дрожжевая генетическая номенклатура довольно сложна и неочевидна для ученых, не имевших ранее с ней дела. Более того, поскольку Михаил Олегович в своей работе проводил крайне сложные генетические эксперименты, он фактически вышел за рамки общепринятой номенклатуры и

был вынужден ее расширить введением собственных условных обозначений. Эти обозначения также приведены в данном разделе, причем с подробными пояснениями. Вообще, данный раздел работы уже заставил меня предположить, что я имею дело с трудом, написанным очень «систематизированным» человеком.

Собственно говоря, это предположение начало подтверждаться уже в следующем разделе работы, а именно во введении. В нем Михаил Олегович в крайне доступных выражениях объясняет читателю, почему важно изучать механизмы секреции у дрожжей, почему были выбраны именно данные виды дрожжей и модельные белки, а не какие-либо другие, почему необходимо было использовать именно выбранные Михаилом Олеговичем экспериментальные подходы. Описав все это, Михаил Олегович формулирует стоявшие перед ним цели и задачи, которые уже не вызывают у подготовленного великолепным введением читателя никаких вопросов, за исключением вопроса о целесообразности поиска дрожжевых белков, влияющих на гомеостаз кальция, каковой поиск постулируется в качестве одной из задач. Во введении про кальций не было сказано не слова, и нужно признать, что здесь «системность» Михаила Олеговича дала некоторый сбой. Впрочем, подробное и не оставляющее никаких вопросов обоснование связи гомеостаза кальция с системой секреции приводится в работе позже, в обзоре литературы.

Как говорится, раз уж речь случайно зашла об обзоре литературы, перейдем к анализу этого раздела работы. Это очень качественный научный текст, в котором во всех подробностях описываются особенности секреторного транспорта белков у различных эукариотических организмов. Я не являюсь специалистом в данной области науки, но, по моему мнению, обзор литературы является абсолютно исчерпывающим. В нем дается подробное описание продвижения белков по секреторному пути, описываются все основные участники данного процесса, приводится очень подробное описание различных моделей функционирования аппарата Гольджи, а также досконально описываются модификации белков, происходящие с ними во время продвижения по пути секреции. Завершается обзор литературы разделом о роли гомеостаза двухвалентных катионов в данных процессах, после которого, собственно говоря, становятся окончательно ясными поставленные Михаилом Олеговичем задачи работы. В целом, автор блестяще справился со стоявшей перед ним задачей описания очень сложного и не до конца изученного пути секреции белков, создав сложный, но логично скомпонованный научный текст. Более того, Михаил Олегович везде, где только это возможно, в дополнение к изложению литературных фактов проводит их анализ, сопоставляет различные результаты друг с другом и делает иногда очень солидные выводы (так, например, автор убедительно доказывает, что множество разных моделей функциональной организации аппарата Гольджи очень мало противоречат друг другу и вполне могут быть реализованы одновременно в разных организмах или даже последовательно в одном и том же организме, находящемся в разных условиях).

Безусловно, у меня есть и претензии к обзору литературы. Самая главная из них (и это общая претензия ко всей работе) относится к расположению

иллюстраций. По совершенно неясной для меня причине Михаил Олегович всегда располагает иллюстрации минимум через две страницы после текста, их описывающего. В результате я, дойдя до иллюстрации, часто уже успевал подзабыть, что же о ней было сказано в тексте. В целом, эта проблема легко решается перелистыванием сразу на нужную иллюстрацию, но все же расположение иллюстраций сразу за соответствующим текстом было бы гораздо правильнее.

Более мелкие вопросы и замечания перечислены ниже:

1. На стр.27 упоминаются дилизиновые мотивы ККХХ и КХКХХ, где Х – любая аминокислота. Непонятно, как мотив может оканчиваться любой аминокислотой, и чем эти мотивы отличаются от мотивов КК и КХК, соответственно.

2. На стр.70 упоминается еще один белковый мотив, [DE]XXXL[LI]. Неясно, что в данном случае означают квадратные скобки.

3. Поскольку обзор литературы действительно сложен для восприятия, в нем крайне выгодно смотрелся бы заключительный раздел, в краткой форме обобщающий все изложенное выше.

После обзора литературы в работе Михаила Олеговича, как и полагается, следует раздел «Материалы и методы», в котором автор в доступной форме приводит описания методик, использованных им в работе, а также штаммов дрожжей и плазмид. Обычно авторов принято хвалить за широкий методологический арсенал работы; здесь же я этого сделать не могу, поскольку Михаил Олегович использовал достаточно ограниченный набор методов. Именно за это я, как то ни парадоксально, его и похвалю. Михаил Олегович, четко понимая стоявшие перед ним цели и задачи, так же четко и последовательно шел к их решению и использовал ровно тот набор методов, который являлся для этого необходимым и достаточным. Фактически, были применены биохимические фракционирования и детекции белков, а также методы дрожжевой генетики (последняя группа методов, кстати, хоть и является некоей разновидностью геной инженерии, крайне разнообразна и сложна методологически).

Одной из немногих моих претензий к данному разделу служит неидеально соблюденный баланс между необходимостью описания методик таким образом, чтобы эксперименты автора можно было воспроизвести по данным описаниям, и нежелательностью излишне подробного изложения стандартных процедур. Так, например, Михаил Олегович приводит пошаговое описание методики выделения плазмидной ДНК посредством щелочного лизиса, которая, вообще говоря, является стандартной. В то же время, упоминаются методика В.В.Кушнирова приготовления образцов для электрофоретического анализа внутриклеточных белков, а также методика зимографии инвертазы по Баллу. Данные методики совершенно точно менее известны научному сообществу, чем метод щелочного лизиса, однако их описания Михаил Олегович не приводит (хотя и дает ссылки на них). Помимо этого, по неясной причине не приводится описание четырех штаммов дрожжей, использованных в работе; в соответствующей таблице сказано, что это описание имеется в разделе «Результаты». Оно действительно

там имеется, однако неясно, почему именно эти 4 штамма из более 50 описанных в таблице удостоились такой чести. Наконец, в данном разделе работы приводится описание методики, по которой Михаил Олегович замещал локус *MOX* на различные варианты *uPA* в геноме дрожжей. Данная методика состоит из двух этапов: сначала ген *TRP3*, следующий сразу за геном *MOX*, замещался на ген *LEU2*, а затем вместо гена *MOX* в геном внедрялся какой-либо экспериментальный ген, слитый с геном *TRP3*. В результате интегрированный на первом этапе ген *LEU2* нарушался. Таким образом, трансформанты были способны расти на среде без триптофана, и для последующих манипуляций их можно было трансформировать плазмидами, несущими маркерный ген *LEU2*. Ровно такая же ситуация достигалась бы одностадийной процедурой, при которой ген *TRP3* был бы оставлен в покое, а ген *MOX* просто был бы заменен на экспериментальный ген, слитый с каким-либо маркерным геном или геном устойчивости к антибиотику. Таким образом, мне осталось совершенно непонятной необходимость сложной двухстадийной процедуры.

Раздел «Результаты» ничем не уступает предыдущим разделам. Он написан так же подробно и логично, но сложно. Последнее, видимо, является в данном случае неким неизбежным злом, поскольку практически все экспериментальные результаты Михаила Олеговича перед формулировкой заключений из них требуют, если можно так выразиться, серьезной логической обработки. Таким образом, описание результатов, полученных Михаилом Олеговичем, представляет собой научный текст высокого уровня сложности, но такого же высокого уровня качества. Автор строго следит за логичностью изложения материала в данном разделе и часто включает в него описания неудавшихся экспериментов, которые, тем не менее, оказываются крайне важными для понимания хода его мысли. Некоторая фрагментарность изложения начинает проявляться только к самому концу раздела, где не всегда понятно, как связаны друг с другом два идущих друг за другом подраздела.

Автор начал свои экспериментальные изыскания с анализа секреции модельного белка *uPA* и его мутантных вариантов в клетках дрожжей и показал, что эта секреция зависит от уровня продукции белка в дрожжах, а также от статуса его гликозилирования. Далее Михаил Олегович при помощи сложного, но абсолютно корректного генетического подхода идентифицировал несколько генов, мутации в которых повышали эффективность секреции; к таковым отнеслись гены маннозо-1-фосфатгуанилтрансферазы и одной из субъединиц комплекса *COPI*, участвующего в транспорте белков через эндоплазматический ретикулум. Помимо этого, при помощи такого же генетического подхода автору удалось показать, что мутации в гене *O*-маннозилтрансферазы *Pmt1* также усиливают эффективность секреции *uPA* за счет улучшения его укладки в секреторном пути. Поскольку именно у дрожжей рода *Ogataea* данный фермент изучен слабо, Михаил Олегович провел его функциональный анализ и выяснил, что он работает несколько иначе, чем хорошо изученный фермент-ортолог пекарских дрожжей *S.cerevisiae*. После этого уже неоднократно упоминавшаяся мной «системность» Михаила Олеговича опять несколько засбоила, поскольку последующая часть работы, хоть и посвящена исследованиям того же самого

секреторного пути, непосредственного отношения к задаче приспособления метилотрофных дрожжей для нужд биотехнологии не имеет. Тем не менее, такое отношение имеется в косвенном виде, поскольку очевидно, что чем больше будет известно о секреторных путях этих дрожжей, тем легче будет использовать их для продукции гетерологичных секретлируемых белков. Итак, автор продемонстрировал, что вакуолярная кальций-зависимая АТФаза Pmc1 связана с чувствительностью клеток дрожжей к детергентам, а также в серии изящных генетических экспериментов установил ранее неочевидную роль везикулярного транспорта в гомеостазе кальция и показал существование нового неизвестного пути доставки кальция в секреторные органеллы.

Таким образом, Михаилом Олеговичем получено огромное количество крайне интересных результатов, которые, тем не менее, вызвали у меня достаточно существенное количество вопросов и замечаний.

1. Михаил Олегович работал с двумя видами метилотрофных дрожжей рода *Ogataea*, а именно *O.polymorpha* и *O.parapolyomorpha*. Из работы не всегда очевидно, почему те или иные эксперименты проводились с дрожжами данного конкретного вида, а не другого или не обоих видов параллельно. Более того, Михаил Олегович идентифицировал некоторые интересующие его мутации, связанные с секреторным путем, только у *O.polymorpha*, а другие – только у *O.parapolyomorpha*. Мне кажется, целесообразно было бы проверить показанную у одного вида дрожжей значимость мутаций на дрожжах другого вида.

2. У меня сложилось ощущение, что на рис.22 дорожки 3 и 4 перепутаны местами.

3. На стр.126 и далее в нескольких местах упоминается использовавшаяся в работе Михаилом Олеговичем «потеря» дрожжами плазмиды с маркерным геном *LEU2*. Очень жаль, что в разделе «Материалы и методы» отсутствует описание соответствующей методики.

4. На стр.132 Михаил Олегович констатирует секрецию мутантом *ret1-27* дополнительных форм uPA, выявляющегося на зимографической картине в виде медленно мигрирующего диффузного пятна. Мне очень не хватило обсуждения вопросов возможного происхождения и структуры этих дополнительных форм белка. Может ли это быть агрегатом строго определенного размера?

5. В разделе 4.3.2 (стр.139-140) Михаил Олегович описывает эксперимент, иллюстрирующий значимость С-концевого сигнала KDEL белка Pmt1 для его задержки в эндоплазматическом ретикулуме. Для этого белок был им удлинен на несколько аминокислот с С-конца, в результате чего вышеупомянутый сигнал располагался уже не на самом С-конце белка и действительно переставал работать. Я бы полагал, что более корректный эксперимент мог бы заключаться в удалении данных четырех аминокислот с С-конца белка.

6. В следующем разделе работы (стр.140-141) Михаил Олегович показывает, что Pmt1 *O.parapolyomorpha* является ортологом Pmt1 *S.cerevisiae*. Мне данное доказательство представляется не до конца убедительным. Автор использовал для этого комплементационный анализ, создал штамм *S.cerevisiae*, лишенный белков Pmt1 и Pmt2, и продемонстрировал восстановление нормального фенотипа после внесения в мутантный штамм гена *PMT1*

*O. parapolymorpha*. Двойной делетант был использован Михаилом Олеговичем на основании того, что отсутствие только гена *PMT1* не имеет серьезных фенотипических проявлений у пекарских дрожжей, и комплементационный анализ на таком штамме был бы невозможен. Однако вышеописанный эксперимент может, строго говоря, также означать, что *Pmt1 O. parapolymorpha* – ортолог *Pmt2 S. cerevisiae*.

7. В следующем разделе (стр.159) Михаил Олегович описывает поиск супрессирующих мутаций и утверждает, что было получено множество трансформантов, из которых локус интеграции плазмиды удалось определить только в трех случаях. Хотелось бы видеть объяснение высокой сложности процесса определения интеграционных локусов, для меня это осталось неясным.

8. На стр.180 автор утверждает, что исследованная им мутация *ret1-27* не влияет на морфологию вакуоли. Однако из рис.67 (стр.182), иллюстрирующего этот тезис, складывается впечатление, что небольшое влияние все же имеется.

9. Раздел 4.8 посвящен устойчивости дрожжей рода *Ogataea* к ортованадату. Термин «ортованадат» в этом разделе используется только один раз, а далее везде говорится о ванадате. Сильно подозреваю, что это одно и то же, однако все же хотелось бы единообразия. Помимо этого, мне бы виделось правильным рассказать хотя бы немного об этом веществе и о том, каковы механизмы его негативного влияния на клетки дрожжей в норме.

В целом, уже из уровня моих замечаний следует, что никаких серьезных претензий к результатам Михаила Олеговича у меня нет. Не вызывает никаких сомнений, что автор получил крайне интересные и достоверные результаты, значимые не только в фундаментальном, но и в прикладном отношении.

После раздела «Результаты» в работе следует их обсуждение, занимающее ни много ни мало 15 страниц. Я считаю, что Михаил Олегович поступил совершенно правильно, так подробно обсудив свои результаты. Во-первых, сделал он это крайне интересно и на высоком научном уровне, а во-вторых, без этого раздела лично я не понял бы ни некоторых деталей его экспериментов, ни отдельных заключений, сделанных на их основании. После обсуждения результатов в работе следует короткий раздел «Заключение», которое, по сути, суммирует все, что было в ней изложено ранее. К этим разделам работы у меня нет никаких вопросов.

Как ни удивительно, довольно много вопросов у меня имеется к выводам, которые Михаил Олегович делает из своей работы. В квалификационных работах выводы должны быть сделаны в экспериментальных терминах и однозначно следовать из полученных результатов. К сожалению, большинство выводов Михаила Олеговича этим критериям не соответствуют. Так, в выводе 3 заявляется о том, что некоторые из идентифицированных автором мутаций могут использоваться в биотехнологии; вывод 4 постулирует арест клеточного цикла в ответ на изменения гомеостаза кальция, в то время как ни одного прямого эксперимента по анализу фаз клеточного цикла в работе проведено не было; в выводе 6 заявляется также не продемонстрированный экспериментально постулат о том, что вакуоль является одним из источников ионов кальция для

секреторных органелл. Помимо этого, Михаил Олегович ни в одном из выводов не указывает, на каком из двух видов дрожжей рода *Ogataea* получен соответствующий результат. Вынужден констатировать, что в написании выводов автор не преуспел. Однако мы все-таки имеем дело не со студенческой курсовой работой, а с докторской диссертацией, для которой этот грех является, на мой взгляд, существенно менее значимым. Самое главное заключается в том, что Михаил Олегович, как я уже неоднократно упоминал, получил набор интересных и достоверных результатов, и некоторая его неудача с выводами на этом фоне безусловно меркнет.

К разделу «Список литературы» у меня замечаний не имеется.

По моему мнению, диссертация Агафонова Михаила Олеговича является завершённой научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и имеющей большое научное и практическое значение. По актуальности изучаемой проблемы, научной новизне, практической значимости и обоснованности выводов представленная работа соответствует требованиям, предъявляемым ВАК Министерства образования и науки Российской Федерации к диссертациям на соискание ученой степени доктора биологических наук, а ее автор, Агафонов Михаил Олегович, заслуживает присуждения искомой степени по специальности 1.5.4. Биохимия.

Профессор кафедры молекулярной биологии биологического факультета ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», доктор биологических наук (научная специальность 03.01.03 – Молекулярная биология)



Каменский Петр Андреевич

09 . 09 . 2021 г.

ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова», биологический факультет  
119234, г. Москва, ул. Ленинские Горы, 1, стр. 12  
Телефон: 8 (495) 939-27-76  
Адрес электронной почты: peter@protein.bio.msu.ru

Подпись П.А. Каменского заверяю  
Декан биологического факультета МГУ,  
академик



М.П. Кирпичников

10 . 09 . 2021 г.