

ЗАКЛЮЧЕНИЕ ДИССЕРТАЦИОННОГО СОВЕТА 24.1.233.01 ПО ЗАЩИТЕ  
ДИССЕРТАЦИЙ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ ДОКТОРА НАУК, НА  
СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ КАНДИДАТА НАУК НА БАЗЕ ФЕДЕРАЛЬНОГО  
ГОСУДАРСТВЕННОГО УЧРЕЖДЕНИЯ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ  
ЦЕНТР "ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ" РОССИЙСКОЙ  
АКАДЕМИИ НАУК» ПО ДИССЕРТАЦИИ НА СОИСКАНИЕ УЧЕНОЙ СТЕПЕНИ  
ДОКТОРА НАУК

аттестационное дело № \_\_\_\_\_

Решение диссертационного совета от 28 октября 2021 г. № 8  
о присуждении Агафонову Михаилу Олеговичу, гражданство Российская Федерация,  
ученой степени доктора биологических наук.

Диссертация "Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolyomorpha*: молекулярно-генетическая модель для изучения секреции белков и гомеостаза ионов кальция" по специальности 1.5.4. Биохимия принята к защите 26 июля 2021 г. (протокол №5) диссертационным советом 24.1.233.01 на базе Федерального государственного учреждения "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук", 119071, Москва, Ленинский проспект, дом 33, строение 2. Совет Утвержден Федеральной службой по надзору в сфере образования и науки (Рособрнадзор), приказ № 2249-1602 от 16.11.2007 г., с учетом изменений в составе Совета в соответствии с приказом Минобрнауки России от 13 февраля 2013 года № 74/нк, от 10 февраля 2014 года № 55/нк и от 30.09.2015 №1166/нк и 13 марта 2019 года № 222/нк), от 03.06.2021 №561/нк.

**Соискатель**

Агафонов Михаил Олегович, 1964 года рождения. В 1988 году окончил Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по специальности биохимия. С 1988 по 2011 год работал в лаборатории молекулярной генетики Института экспериментальной кардиологии Российского

кардиологического научно-производственного комплекса МЗ РФ. В 1998 году защитил диссертацию на соискание степени кандидата биологических наук «Система вектор-хозяин для экспрессии гетерологичных секретируемых белков в клетках дрожжей *Hansenula polymorpha*» по специальности 03.00.03 - Молекулярная биология (диплом КТ №053701). В 2011 году перешел на работу в лабораторию молекулярной генетики Института биохимии имени А.Н. Баха РАН, а в 2018 году стал руководителем группы генной инженерии низших эукариот этого института. Диссертационная работа Агафонова Михаила Олеговича «Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolyomorpha*: молекулярно-генетическая модель для изучения секреции белков и гомеостаза ионов кальция» выполнена в лаборатории молекулярной генетики института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН».

#### **Официальные оппоненты:**

**Синеокий Сергей Павлович** – доктор биологических наук, профессор, Национальный биоресурсный центр – Всероссийская коллекция промышленных микроорганизмов Федерального государственного бюджетного учреждения «Государственный научно-исследовательский институт генетики и селекции промышленных микроорганизмов Национального исследовательского центра «Курчатовский институт» (НИЦ «Курчатовский институт» -ГосНИИгенетика), директор.

**Каменский Петр Андреевич** – доктор биологических наук, кафедра молекулярной биологии биологического факультета ФГБОУ ВО "Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова", профессор.

**Люкманова Екатерина Назымовна** – доктор биологических наук, лаборатория биоинженерии нейромодуляторов и нейрорецепторов, ФГБУН Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, заведующий.

Выбор официальных оппонентов был обусловлен:

тем, что

Синеокий Сергей Павлович является одним из ведущих специалистов в области конструирования рекомбинантных микроорганизмов, включая различные виды дрожжей, для биотехнологического использования.

тем, что

Каменский Петр Андреевич является одним из ведущих специалистов в области молекулярной биологии, биохимии и молекулярной генетики дрожжей.

тем, что

Люкманова Екатерина Назымовна является одним из ведущих специалистов в области биоинженерии белка. Проводимые ею исследования включают использование белков, получаемых в рекомбинантных микроорганизмах.

Квалификация официальных оппонентов подтверждается наличием у них большого количества публикаций в международных и отечественных рецензируемых научных изданиях.

Все три официальных оппонента дали положительные отзывы на диссертацию Агафонова М.О.

### **Ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук (ИМБ РАН) в своем положительном отзыве, составленном главным научным сотрудником лаборатории конформационного полиморфизма белков в норме и патологии, доктором биологических наук Митькевичем Владимиром Александровичем и утвержденном ВРИО Директора ИМБ РАН, членом-корреспондентом РАН Георгиевой Софией Георгиевной, указала, что диссертация Агафонова М.О. является завершенной высококачественной научно-квалификационной работой, которая соответствует требованиям п.9 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24.09.13 №842),

предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Выбор ведущей организации был обусловлен тем, что Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта РАН является признанным научным центром в области биохимии, молекулярной и клеточной биологии, который имеет в своем составе подразделения, применяющие рекомбинантные белки, а также подразделения, использующие в качестве модельных объектов различные виды дрожжей. Таким образом, сотрудники ИМБ РАН, в том числе подписавший отзыв Митькевич В.А., являются высококвалифицированными специалистами в областях, связанных с темой диссертационной работы Агафонова М.О.

## Публикации

Результаты диссертационной работы Агафонова М.О. опубликованы в 24 статьях в российских и международных рецензируемых журналах, индексируемых Web of Science и входящих в перечень ВАК РФ, а также в главе в книге, что соответствует требованиям п. 11 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства Российской Федерации от 24.09.2013 г. №842.

## СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ

Статьи в международных журналах

1. **Agaphonov MO**, Trushkina PM, Sohn JH, Choi ES, Rhee SK, Ter-Avanesyan MD. 1999. Vectors for rapid selection of integrants with different plasmid copy numbers in the yeast *Hansenula polymorpha* DL1. *Yeast* **15**:541-51.
2. Sohn JH, Choi ES, Kang HA, Rhee JS, **Agaphonov MO**, Ter-Avanesyan MD, Rhee SK. 1999. A dominant selection system designed for copy-number-controlled gene integration in *Hansenula polymorpha* DL-1. *Appl Microbiol Biotechnol.* **51**:800-807.

3. **Agaphonov MO**, Packeiser AN, Chechenova MB, Choi ES, Ter-Avanesyanyan MD. 2001. Mutation of the homologue of GDP-mannose pyrophosphorylase alters cell wall structure, protein glycosylation and secretion in *Hansenula polymorpha*. *Yeast*. **18**:391-402.
4. Kim MW, **Agaphonov MO**, Kim JY, Rhee SK, Kang HA. 2002. Sequencing and functional analysis of the *Hansenula polymorpha* genomic fragment containing the YPT1 and PMI40 genes. *Yeast* **19**:863-871.
5. **Agaphonov MO**, Romanova NV, Trushkina PM, Smirnov VN, Ter-Avanesyanyan MD. 2002. Aggregation and retention of human urokinase type plasminogen activator in the yeast endoplasmic reticulum. *BMC Mol Biol.* **3**:15.
6. Kim SY, Sohn JH, Bae JH, Pyun YR, **Agaphonov MO**, Ter-Avanesyanyan MD, Choi ES. 2003. Efficient library construction by in vivo recombination with a telomere-originated autonomously replicating sequence of *Hansenula polymorpha*. *Appl Environ Microbiol.* **69**:4448-4454.
7. Chechenova MB, Romanova NV, Deev AV, Packeiser AN, Smirnov VN, **Agaphonov MO**, Ter-Avanesyanyan MD. 2004. C-terminal truncation of alpha-COP affects functioning of secretory organelles and calcium homeostasis in *Hansenula polymorpha*. *Eukaryot Cell* **3**:52-60.
8. **Agaphonov M**, Romanova N, Sokolov S, Iline A, Kalebina T, Gellissen G, Ter-Avanesyanyan M. 2005. Defect of vacuolar protein sorting stimulates proteolytic processing of human urokinase-type plasminogen activator in the yeast *Hansenula polymorpha*. *FEMS Yeast Res* **5**:1029-1035. doi: 10.1016/j.femsyr.2005.07.003.
9. **Agaphonov MO**, Sokolov SS, Romanova NV, Sohn JH, Kim SY, Kalebina TS, Choi ES, Ter-Avanesyanyan MD. 2005. Mutation of the protein-O-mannosyltransferase enhances secretion of the human urokinase-type plasminogen activator in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* **22**:1037-1047.
10. **Agaphonov MO**, Plotnikova TA, Fokina AV, Romanova NV, Packeiser AN, Kang HA, Ter-Avanesyanyan MD. 2007. Inactivation of the *Hansenula polymorpha* *PMR1* gene affects cell viability and functioning of the secretory pathway. *FEMS Yeast Res.* **7**:1145-52.
11. **Agaphonov M**, Romanova N, Choi ES, Ter-Avanesyanyan M. 2010. A novel kanamycin/G418 resistance marker for direct selection of transformants in *Escherichia coli* and different yeast species. *Yeast* **27**:189-95.

12. Fokina AV, Sokolov SS, Kang HA, Kalebina TS, Ter-Avanesyan MD, **Agaphonov MO**. 2012. Inactivation of Pmc1 vacuolar Ca<sup>2+</sup> ATPase causes G<sub>2</sub> cell cycle delay in *Hansenula polymorpha*. *Cell Cycle*. 11:778-784.
13. Kim H, Moon HY, Lee DJ, Cheon SA, Yoo SJ, Park JN, **Agaphonov MO**, Oh DB, Kwon O, Kang HA. 2013. Functional and molecular characterization of novel *Hansenula polymorpha* genes, HpPMT5 and HpPMT6, encoding protein O-mannosyltransferases. *Fungal Genet Biol*. **58-59**:10-24.
14. **Agaphonov M**, Alexandrov A. 2014. Self-excising integrative yeast plasmid vectors containing an intronated recombinase gene. *FEMS Yeast Res*. 14:1048-1054.
15. Kim H, Thak EJ, Lee DJ, **Agaphonov MO**, Kang HA. 2015. Hansenula polymorpha Pmt4p Plays Critical Roles in O-Mannosylation of Surface Membrane Proteins and Participates in Heteromeric Complex Formation. *PLoS One*. **10**:e0129914.
16. Moon HY, Cheon SA, Kim H, **Agaphonov MO**, Kwon O, Oh DB, Kim JY, Kang HA. 2015. *Hansenula polymorpha* Hac1p Is Critical to Protein N-Glycosylation Activity Modulation, as Revealed by Functional and Transcriptomic Analyses. *Appl Environ Microbiol*. **81**:6982-6993.
17. Fokina AV, Chechenova MB, Karginov AV, Ter-Avanesyan MD, **Agaphonov MO**. 2015. Genetic Evidence for the Role of the Vacuole in Supplying Secretory Organelles with Ca<sup>2+</sup> in *Hansenula polymorpha*. *PLoS One*. 10:e0145915.
18. Karginov A, **Agaphonov M**. 2016 A simple enrichment procedure improves detection of membrane proteins by immunoblotting. *Biotechniques*. 61:260-261.
19. **Agaphonov MO**. 2017 Improvement of a yeast self-excising integrative vector by prevention of expression leakage of the intronated Cre recombinase gene during plasmid maintenance in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Lett*. 364(22):10.1093/femsle/fnx222.
20. Karginov AV, Fokina AV, Kang HA, Kalebina TS, Sabirzyanova TA, Ter-Avanesyan MD, **Agaphonov MO**. 2018. Dissection of differential vanadate sensitivity in two *Ogataea* species links protein glycosylation and phosphate transport regulation. *Sci Rep*. **8**:16428.
21. Alexandrov AI, Grosfeld EV, Dergalev AA, Kushnirov VV, Chuprov-Netochin RN, Tyurin-Kuzmin PN, Kireev II, Ter-Avanesyan MD, Leonov SV, **Agaphonov MO**. 2019. Analysis of

novel hyperosmotic shock response suggests 'beads in liquid' cytosol structure. *Biol Open*. 8:bio044529.

#### Статьи в российских изданиях

1. Богданова А.И., **Агафонов М.О.**, Тер-Аванесян М.Д. 2000. Нестабильность плазмид у метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*: захваты фрагментов хромосомной ДНК интегративными плазмидами. *Молекулярная Биология* **34**:28-35
2. Богданова А.И., **Агафонов М.О.**, Тер-Аванесян М.Д. 2000. Нестабильность плазмид у метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*: захваты фрагментов хромосомной ДНК репликативными плазмидами. *Молекулярная Биология* **34**:36-40
3. **Агафонов М.О.**, Деев А.В., Kim S.-Y., Sohn J.-H., Choi E.-S., Тер-Аванесян М.Д. 2003. Новый подход к клонированию и функциональному анализу геномной ДНК метилотрофных дрожжей *Hansenula polymorpha*. *Молекулярная Биология* **37**:81-87

#### Глава в книге

Kang HA, Sohn JH, **Agaphonov MO**, Choi ES, Ter-Avanesyanyan MD, Ree SK. Development expression system for the production of recombinant proteins in *Hansenula polymorpha* DL-1. In: Gellissen G. (ed.) *Hansenula polymorpha*: Biology and Applications. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 2002.

Результаты диссертационного исследования Агафопова М.О. были представлены в виде устных и стендовых сообщений на международных конференциях:

21 Специализированном симпозиуме по дрожжам в 2001 году (Львов, Украина), 2, 3 и 4 конференции HPWN, в 2002, 2004, 2006 годах, в Лагуна (Испания), Альгеро (Италия), Харен (Нидерланды), соответственно, 12 международном конгрессе по дрожжам в 2008, Киев (Украина), 28 международной конференции по генетике и молекулярной биологии дрожжей в 2017 г., Прага (Чехия), международной конференции "Non-conventional Yeasts:

from Basic Research to Application" в 2018 г., Жешув (Польша), а также российских конгрессах : III съезде Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) в 2004 г. в Москве, III съезде Российского Биохимического общества в 2002 году, в Санкт-Петербурге, съезде генетиков и селекционеров, посвященном 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина и V Съезде ВОГиС в 2009 г. в Москве.

Избранные тезисы докладов:

1. III съезд Вавиловского общества генетиков и селекционеров (ВОГиС) "Генетика в XXI веке: современное состояние и перспективы развития". 6-12 июня 2004, Москва. Чеченова МБ, Романова НВ, **Агафонов МО**. Механизмы, обуславливающие "сверхсекреторный" фенотип у мутантов дрожжей. Сборник тезисов, т.1., стр. 346
2. 2nd *Hansenula polymorpha* worldwide network conference. 26-29 September , 2002, University La Laguna, Tenerife, Canary Islands. **Agaphonov MO**, Romanova NV, Chechenova MB, Ter-Avanesyan MD. Heterologous protein secretion as a model for study of eukaryotic secretory pathway. Abstract book. p. 17.
3. III съезд Российского Биохимического общества. 26 июня -1 июля 2002, Санкт-Петербург, Россия. Чеченова МБ, Романова Н.В., **Агафонов МО**. Урокиназа человека как модель для изучения механизмов секреции у дрожжей. Тезисы докладов, стр 124.
4. 21st International specialized symposium on yeasts: "Biochemistry, genetics, biotechnology and ecology of non-conventional yeasts". 21-25 August, 2001, Lviv, Ukraine. **Agaphonov MO**., Romanova NV, Chechenova MB and Ter-Avanesyan MD. Secretion of the human urokinase by yeasts *Saccharomyces cerevisiae* and *Hansenula polymorpha*. Book of Abstracts, p. 109.
5. Съезд генетиков и селекционеров, посвященный 200-летию со дня рождения Ч. Дарвина и V Съезда ВОГиС. 21-28 июня 2009. **Агафонов М.О.**, Ильина А.В., Фокина А.В. Контроль укладки белков в секреторном пути *Hansenula polymorpha*. Тезисы. с. 59.
6. 12<sup>th</sup> International Congress on Yeasts. August 11-15 2008. **Agaphonov M.**, Fokina A., Chechenova M., Ter-Avanesyan M. Interrelationship between functioning of secretory organelles and Ca<sup>2+</sup> homeostasis in *Hansenula polymorpha*. Abstract Book.

7. 4<sup>th</sup> *Hansenula polymorpha* worldwide network conference. 3-5 September 2006. **Agaphonov M.O.**, Chechenova M.B., Plotnikova T.A., Fokina A.V. Ter-Avanesyan M.D. Genetic analysis of Ca<sup>2+</sup> trafficking in the secretory pathway of *Hansenula polymorpha*. Abstract Book.
8. 28<sup>th</sup> International Conference on Yeast Genetics and Molecular Biology (ICYGMB). August 27 – September 1, 2017. Agaphonov M, Karginov A, Fokina A, Ter-Avanesyan M. Resistance of *Ogataea* (*Hansenula*) *polymorpha* to Orthovanadate: the Roles of the Phosphate Transport Control and of Mannoprotein Phosphomannosylation. Abstract book.
9. International conference "Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application". May 15-18, 2018. Karginov A, Ter-Avanesyan M, **Agaphonov M.** Role of protein glycosylation in the regulation of phosphate uptake in *Ogataea polymorpha* and *O. parapolymorpha*. Program and abstract book.

В указанных публикациях адекватно отражены результаты исследования, представленного в диссертационной работе Агафонова М.О.

**На диссертацию поступили следующие отзывы:**

Отзыв официального оппонента, доктора биологических наук, профессора **Синеокого Сергея Павловича** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

Для оценки усиления секреции в выделенных мутантах было бы полезным оценить, в каком диапазоне продуктивности наблюдались эффекты усиления секреции и насколько максимально увеличился уровень накопления белка в культуральной жидкости в г/л.

Автор логично предлагает использовать в дальнейшем при создании продуцентов различных белков выявленные мутации в генах *PMT1* и *OPU*. В то же время, учитывая высокую частоту отбора мутантов с улучшенной секрецией *uPA*, можно допустить, что в различных диапазонах продуктивности и для различных экспрессируемых белков эффект могут дать мутации в различных генах и величина этого эффекта может значительно различаться. Стоит учесть, что некоторое ухудшение роста клеток, особенно после

индукции экспрессии клонированных генов, несущественно для использования промышленных продуцентов.

Поскольку отбор мутантов с повышенной секрецией позволяет использовать в качестве репортеров различные ферменты, активность которых тестируется на агаризованных средах, было бы интересно разработать аналогичные методы при использовании различных репортерных ферментов и посмотреть их эффективность при различных диапазонах базовой продуктивности, а затем сравнить эффективность различных мутаций для усиления секреции различных белков.

Потенциальный интерес представляет также проверка эффективности сочетания различных мутаций, улучшающих секрецию, для различных белков и в различных диапазонах продуктивности.

В тексте с незначительной частотой встречаются ошибки и опечатки.

Отзыв официального оппонента, доктора биологических наук, профессора **Каменского Петра Андреевича** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

В обзоре литературы иллюстрации располагаются минимум через две страницы от текста, их описывающего. Расположение иллюстраций сразу за соответствующим текстом было бы гораздо правильнее.

На стр. 27 упоминаются дилизиновые мотивы KKXX и KXXXX, где X – любая аминокислота. Непонятно, как мотив может оканчиваться любой аминокислотой, и чем эти мотивы отличаются от мотивов KK и KXK, соответственно.

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

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

В разделе «Материалы и методы» неидеально соблюден 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.

Замечания к разделу «Результаты»:

1. Михаил Олегович работал с двумя видами метилотрофных дрожжей рода *Ogataea*, а именно *O.polymorpha* и *O.parapolymorpha*. 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.parapolymorpha*. Мне кажется,

целесообразно было бы проверить показанную у одного вида дрожжей значимость мутаций на дрожжах другого вида.

2. ... 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 uРА, 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. parapolymorpha* является ортологом Pmt1 *S.cerevisiae*. ... 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.

Замечания к разделу «Выводы»:

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.

Отзыв официального оппонента, доктора биологических наук, **Люкмановой Екатерины Назымовны** (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

В качестве рекомбинантных модельных белков в работе были использованы три – инвертаза *Saccharomyces cerevisiae*, глюкозооксидаза *Aspergillus niger* и uPA человека. Однако в автореферате работы упоминается только uPA человека. При этом только он из

использованных модельных белков является плохо секретлируемым клетками дрожжей. Поэтому остается вопрос, насколько могут быть применимы идентифицированные в работе мутации, увеличивающие секрецию uPA, при конструировании продуцентов других рекомбинантных белков.

Также в работе активно обсуждается, как меняется содержание катионов кальция в секреторных органеллах только на основании данных о влиянии мутаций на способность клеток расти на средах с недостатком или избытком солей кальция. Хотелось бы прояснить, была ли возможность оценить концентрацию кальция непосредственно в клетках дрожжей *O. polymorpha*.

Отзыв **ведущей организации** Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт молекулярной биологии имени В.А. Энгельгардта Российской академии наук» (положительный). Отзыв содержит следующие вопросы и замечания:

Изложенные в работе заключения о нарушениях гомеостаза кальция сделаны на основе изучения физиологических проявлений различных мутаций. Можно ли было какими-то прямыми методами определить концентрацию кальция в цитозоле и секреторных органеллах?

**На автореферат диссертации поступили положительные отзывы от:**

**Гулий Ольги Ивановны**, доктора биологических наук, профессора, ведущего научного сотрудника лаборатории биохимии ФГБУН Института биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, замечаний нет

**Есипова Романа Станиславовича**, доктора химических наук, заведующего лабораторией биофармацевтических технологий ИБХ РАН. В отзыве в качестве пожелания указывается, что хорошо было бы проверить, могут ли полученные в работе мутации, влияющие на укладку модельного белка, увеличивать эффективность секреции других чужеродных белков, для которых проблематично достичь высокой продуктивности в клетках дрожжей.

**Журавлевой Галины Анатольевны**, доктора биологических наук, профессора кафедры генетики и биотехнологии СПбГУ, замечаний нет.

**Калебиной Татьяны Сергеевны**, доктора биологических наук, профессора, ведущего научного сотрудника кафедры молекулярной биологии Биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова, замечаний нет.

**Кулаковской Татьяны Валентиновны**, доктора биологических наук, заведующей лабораторией регуляции биохимических процессов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, замечаний нет.

**Симоновой Ольги Борисовны**, доктора биологических наук, заведующей лабораторией молекулярно-генетических процессов развития Института биологии развития РАН. В качестве замечания указано на отсутствие в автореферате рисунка, отражающего схему биохимического пути, изучаемого автором и суммирующего влияние на него внесенных автором мутаций.

**Наумовой Елены Сергеевны**, доктора биологических наук, заведующей лабораторией молекулярной генетики дрожжей, ГосНИИ генетики и селекции промышленных микроорганизмов, НИЦ «Курчатовский институт», замечаний нет.

**С вопросами выступили:**

Шумянцева В.В., Гусев Н.Б., Марданов А.В., Юрина Н.П., Александров А.И.,

Гусаков А.В.

**В дискуссии приняли участие**

Звягильская Р.А.

Диссертационный Совет отмечает, что в ходе диссертационного исследования Агафонова М.О. получены следующие основные результаты:

1. Разработана модель для изучения факторов, влияющих на эффективность секреции рекомбинантных белков дрожжами *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*. Эта модель позволяет выявлять условия, улучшающие укладку чужеродных белков в

эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) на примере человеческого активатора пламиногена урокиназного типа (uPA).

2. Показано, что эффективность укладки uPA в ЭР дрожжей рода *Ogataea* возрастает при нарушении синтеза ГДФ-маннозы, при делеции С-концевого домена  $\alpha$ -субъединицы окаймляющего комплекса COPI, при дефекте О-гликозилирования растворимых белков в ЭР и при инактивации  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи.

3. Обнаружено, что при нарушениях компонентов, обеспечивающих транспорт белков из аппарата Гольджи в вакуоль, усиливается протеолитическая активация секретируемого uPA без увеличения эффективности секреции этого белка.

4. Идентифицирован ген *ABVI* *O. polymorpha*, который кодирует фермент, катализирующий фосфоманнозилирование гликозидных цепей белков в секреторном пути и обеспечивающий высокую резистентность *O. polymorpha* к ортованадату.

5. Обнаружено, что нарушение гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$ , вызванное инактивацией вакуолярной  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы, стимулирует остановку перехода клеточного цикла от фазы  $G_2$  к митозу. Одним из проявлений этого эффекта является увеличение чувствительности клеток к присутствию в среде додецилсульфата натрия.

6. Показано, что у дрожжей *O. polymorpha* снижение жизнеспособности клеток при одновременной инактивации вакуолярной  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФазы и  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи связано с недостатком  $\text{Ca}^{2+}$  в ранних компартментах секреторного пути. Это свидетельствовало о том, что в клетках дрожжей существует путь доставки  $\text{Ca}^{2+}$  в секреторные органеллы из источника, независимого от  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи. В этом пути задействован везикулярный транспорт, осуществляемый при участии компонентов окаймляющего комплекса COPI.

**Теоретическая значимость** представленного исследования заключается в том, что:

Получены данные, свидетельствующие о наличии пути доставки  $\text{Ca}^{2+}$  в ранние компартменты секреторного пути из источника, независимого от  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи. Показано, что таким источником может быть вакуоль, и что в транспорте  $\text{Ca}^{2+}$  принимают участие компоненты окаймляющего комплекса COPI. Продемонстрировано влияние гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  на регуляцию клеточного цикла у дрожжей рода *Ogataea*. Разработана модельная система на основе белка uPA, использование которой

позволяет изучать факторы, влияющие на укладку белков в секреторном пути, а также идентифицировать мутации, нарушающие транспорт белков в вакуоль у дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*.

**Практическая значимость** представленного исследования заключается в том, что:

Были разработаны подходы для оптимизации продукции секретируемых белков в клетках дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*. Эти подходы могут быть использованы при конструировании промышленных штаммов-продуцентов рекомбинантных белков. Данные о физиологических проявлениях мутаций, увеличивающих эффективность секреции рекомбинантного белка, позволяют определить, насколько оправдано использование таких мутаций при конструировании промышленных штаммов-продуцентов.

**Оценка достоверности** полученных в работе результатов показала, что

- использованные в работе методы и подходы адекватны поставленным задачам;
- результаты, полученные в диссертационном исследовании, достоверны и воспроизводимы.
- выводы отражают наиболее значимые результаты диссертационного исследования.

**Личный вклад соискателя** состоит в том, что планирование и проведение экспериментов, вошедших в диссертационное исследование, и интерпретация полученных данных осуществлялись либо им лично, либо под его непосредственным руководством.

## **ЗАКЛЮЧЕНИЕ**

Диссертация Агафонова М.О. является законченной научно-квалификационной работой. Она выполнена в соответствии с логичным планом исследования с использованием современных методов, которые адекватны поставленным задачам. В рамках диссертационной работы Агафонова М.О. проведен большой объем исследований, результаты которых обладают несомненной новизной и актуальностью. Выводы и положения диссертации, выносимые на защиту, логически вытекают из результатов исследования. Их обоснованность подтверждается публикациями автора, включающих 24 статей в рецензируемых научных изданиях и главу в книге. Диссертационное исследование

