



**МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ**
**Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта
Российской академии наук
(ИМБ РАН)**

Вавилова ул., д. 32, ГСП-1, В-334, Москва, 119991; Для телеграмм: Москва ИМБ РАН В-334,
тел. 8-499-135-23-11, 8-499-135-11-60; факс 8-499-135-14-05, E-mail: isinfo@eimb.ru
ОКПО 02699501, ОГРН 1037736018066, ИНН/КПП 7736055393/773601001

_____ № _____

На № _____ от _____

«УТВЕРЖДАЮ»

ВРИО Директора ИМБ РАН
Член-корреспондент РАН



_____ С.Г. Георгиева

«08» сентября 2021 г.

ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

на диссертационную работу Агафонова Михаила Олеговича "Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha*: 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.

Актуальность темы диссертационной работы

Появление методов генной инженерии открыло возможность для получения штаммов микроорганизмов, продуцирующих чужеродные рекомбинантные белки, которые востребованы в разных отраслях экономики и медицины. Существенная часть таких белков происходят из эукариотических организмов и являются секретируемыми. При продукции внутри клеток бактерий такие белки, как правило, оказываются неспособными принять правильную конформацию, и их получение включает дорогостоящие этапы рефолдинга и очистки от токсических примесей. Одним из подходов для решения этой проблемы является использование в качестве хозяина для продукции рекомбинантных секретируемых белков одноклеточных эукариотических организмов, в

частности, дрожжей. Естественным образом первым видом дрожжей, использованным для этих целей, стал классический модельный объект молекулярно-биологических и генетических исследований - пекарские дрожжи *Saccharomyces cerevisiae*. Со временем ряд других дрожжей стали использовать для продукции рекомбинантных белков в связи с рядом преимуществ перед *S. cerevisiae* для промышленного применения. К таким видам дрожжей относятся *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha*, которые являются объектом исследования в данной диссертации. Во многих случаях чужеродные белки недостаточно эффективно секретируются клетками дрожжей и/или получают нежелательные модификации при прохождении пути секреции. Можно было предполагать, что какие-то модификации процесса секреции у штамма хозяина могут дать возможность решить эту проблему. Однако отсутствие знаний об устройстве секреторного аппарата у метилотрофных дрожжей, в частности у *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*, существенно ограничивало применение такого подхода для этих промышленно востребованных видов. Данная диссертационная работа является очень актуальной, поскольку направлена на изучение особенностей устройства секреторного аппарата этих двух видов дрожжей, на анализ "узких мест" для секреции рекомбинантных белков и на изучение физиологических последствий мутаций, влияющих на эти "узкие места".

Структура диссертации

Диссертация построена по традиционному плану. Основные разделы диссертации включают «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Выводы», «Заключение» и список цитированной литературы, включающий 492 источника. Диссертация изложена на 244 страницах и содержит 10 таблиц и 69 рисунков.

Содержание диссертации

В разделе «Введение» автор убедительно обосновывает актуальность направления исследования, формулирует цель работы и перечисляет экспериментальные задачи, которые были поставлены для достижения этой цели.

Раздел «Обзор литературы» посвящен описанию известных к настоящему времени механизмов секреции белков эукариотическими клетками, начиная с транслокации белка в просвет эндоплазматического ретикула и заканчивая выходом белка на поверхности плазматической мембраны. В «Обзоре литературы» достаточно подробно описаны посттрансляционные модификации белков, происходящие в секреторном пути. Кроме того, есть описание неканонических механизмов секреции белков у эукариот. Отдельное внимание уделено особенностям устройства секреторного аппарата у дрожжей, что важно для понимания экспериментальных данных автора, приведенных в следующих разделах диссертации.

В разделе «Материалы и методы» описаны использованные в работе методики, штаммы микроорганизмов и плазмиды с детализацией, достаточной для понимания материала, изложенного в следующих разделах.

В разделе «Результаты» подробно описаны полученные в работе экспериментальные данные. Этот материал условно можно разделить на 4 основные взаимосвязанные части: (I) выбор репортерного белка для изучения секреции и характеристика его продукции в клетках дрожжей *O. polymorpha*, (II) получение и анализ мутаций, увеличивающих эффективность секреции репортерного белка, (III) изучение проявлений нарушения процессов поддержания гомеостаза кальция в клетке в результате инактивации вакуолярной кальциевой АТФазы и (IV) изучение взаимодействий мутаций, влияющих на гомеостаз кальция в секреторных органеллах.

В первой части приводятся данные об анализе продукции секретируемого человеческого белка uPA в клетках дрожжей *O. parapolyomorpha*. Эти данные показывают, что добиться высокого уровня продукции секретируемого uPA за счет увеличения синтеза этого белка в клетке нельзя. Это было связано с тем, что белок неэффективно принимает правильную конформацию в эндоплазматическом ретикулуме клеток дрожжей, а высокий уровень синтеза приводит к накоплению несвернутых молекул в этом компартменте, что дополнительно ухудшает условия для его укладки и приводит к образованию высокомолекулярных агрегатов.

Выявленный дефект укладки uPA делает его удобным репортером для идентификации мутаций, улучшающих условия для укладки белка в эндоплазматическом ретикулуме. Поиск и характеристика таких мутаций описаны во второй части раздела «Результаты». В частности, такой фенотип был выявлен у мутаций, нарушающих гликозилирование белков в секреторном пути, у мутации, повреждающей С-концевой домен альфа-субъединицы окаймляющего домена комплекса COPI, и у нарушения Ca^{2+}/Mn^{2+} -АТФазы аппарата Гольджи. Кроме того, в этой части работы было обнаружено, что поиск мутантов с увеличенной продукцией активного uPA позволяет идентифицировать мутации, нарушающие сортировку белков в вакуоль. Однако в этом случае не было реального увеличения эффективности секреции, а наблюдаемый эффект определялся усилением протеолитического процессинга uPA, превращающего зимоген в активный белок.

Ряд этапов процесса секреции белков зависят от катионов Ca^{2+} , снабжение секреторных органелл которыми обеспечивается исследованной во второй части раздела «Результаты» Ca^{2+}/Mn^{2+} -АТФазы аппарата Гольджи. Источником этих катионов является цитозоль, где концентрация Ca^{2+} поддерживается на низком уровне, в существенной степени, за счет действия вакуолярной кальциевой АТФазы. В третьей части раздела «Результаты» автор описывает эксперименты по изучению проявлений инактивации гена, кодирующего этот белок. В частности, было обнаружено, что такая мутация может приводить к задержке перехода клеточного цикла от фазы G2 к митозу. С этой задержкой каким-то образом оказалась связана повышенная чувствительность клеток мутанта к додецилсульфату натрия. Такой фенотип часто выявляется при нарушениях гликозилирования, что объясняют нарушением клеточной стенки. Однако у исследованного мутанта таких нарушений выявлено не было, и наличие этого фенотипа выглядит труднообъяснимым.

Во второй и третьей частях раздела «Результаты» было описано получение и характеристика ряда мутаций *O. polymorpha* и *O. parapolyomorpha*, влияющих на гомеостаз кальция в клетке, а также на транспорт белков между секреторными органеллами и основным депо кальция у дрожжей, вакуолью. В четвертой части этого раздела описаны эксперименты по изучению взаимодействия этих мутаций. В частности, было обнаружено, что нарушение С-концевого домена альфа-субъединицы окаймляющего комплекса COP1 существенно усиливает физиологические последствия инактивации кальциевой АТФазы секреторного пути, приводя к летальности, но не имеет такого эффекта в штамме с нарушением кальциевой АТФазы вакуоли. Было показано, что, в отличие от дрожжей *S. cerevisiae*, у которых одновременное нарушение этих двух кальциевых АТФаз приводит к гибели клеток из-за активации кальциневрина в результате сильного повышения концентрации кальция в цитозоле, у дрожжей *O. polymorpha* объединение этих мутаций не столь фатально, а негативный эффект этого объединения вызван в большей степени недостатком кальция в секреторных органеллах, чем его избытком в цитозоле. Кроме того, были изучены эффекты нарушения С-концевого домена альфа-субъединицы окаймляющего комплекса COP1 и комбинаций этой мутации со специфическими нарушениями транспорта между секреторными органеллами и вакуолью на созревание модельного вакуолярного белка и белка клеточной стенки.

Раздел «Обсуждение» посвящен анализу полученных в работе данных и логическому обоснованию выводов. В частности, обсуждены возможные механизмы, приводящие к увеличению эффективности секреции модельного белка у изученных в работе мутантов дрожжей. Проанализированы данные о генетическом взаимодействии мутаций, влияющих на гомеостаз кальция у *O. polymorpha*. На основании этих данных было сделано заключение о том, что компоненты окаймляющего комплекса COP1 участвуют в доставке катионов кальция в секреторные органеллы из источника, независимого от кальциевой АТФазы секреторного пути, и что таким источником может выступать вакуоль.

В разделе «Заключение» кратко суммированы основные достижения работы.

Научная новизна полученных в работе результатов

В работе впервые были изучены причины низкой эффективности секреции клетками дрожжей человеческого активатора плазминогена урокиназного типа (uPA). Было показано, что этот белок с низкой эффективностью принимает правильную конформацию в дрожжевом секреторном пути, что при высоких уровнях продукции приводит к его накоплению в форме высокомолекулярных агрегатов. Был выявлен и охарактеризован ряд мутаций, приводящих к улучшению условий для укладки модельного белка в секреторном пути *O. polymorpha* и *O. parapolyomorpha*. Было показано, что таким свойством обладают определенные нарушения гликозилирования белков в секреторном пути. В работе было обнаружено, что с использованием в качестве репортерного белка uPA можно выявлять мутации, нарушающие сортировку белков в вакуоль. Впервые было выявлено участие компонентов окаймляющего комплекса COP1 в поддержании гомеостаза катионов Ca^{2+} в клетке. Получены экспериментальные свидетельства об участии

компонентов комплекса COP1 в доставке катионов Ca^{2+} в секреторные органеллы из источника, независимого от кальциевой АТФазы аппарата Гольджи. О существовании этого пути ранее не было известно.

Практическая значимость работы

Часть диссертации посвящена использованию различных подходов для оптимизации продукции модельного секретируемого белка в клетках *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*. Полученные в результате этой работы данные могут быть использованы для разработки стратегии оптимизации продукции других рекомбинантных секретируемых белков в клетках дрожжей с целью создания промышленных штаммов-продуцентов. В работе получены важные данные о физиологических проявлениях мутаций, увеличивающих эффективность секреции рекомбинантного белка. Эти данные также должны учитываться при конструировании промышленных штаммов-продуцентов секретируемых белков.

Обоснованность выводов

Все выводы диссертации сделаны на основе данных большого количества тщательно проведенных экспериментов. Эти эксперименты проводились с использованием современных методов биохимии, молекулярной биологии, классической и молекулярной генетики. Поэтому обоснованность выводов не вызывает сомнения.

Полнота изложения материалов диссертации в публикациях автора

Все данные экспериментов, приведенных в работе, были опубликованы в рецензируемых научных изданиях. Основные положения и результаты диссертации отражены в автореферате. По материалам работы опубликовано 24 статьи, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, из которых 21 статья в международных журналах и 3 – в отечественных. Автореферат отражает основные положения и результаты диссертационной работы.

Вопросы, замечания и комментарии к работе

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

Эти замечания не носят принципиального характера и не подвергают сомнению корректность сделанных в диссертации выводов.

Заключение

Диссертация Агафонова Михаила Олеговича "Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha*: молекулярно-генетическая модель для изучения секреции белков и гомеостаза ионов кальция", представленная на соискание ученой

степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, является завершенной высококачественной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком методическом уровне и имеющей большое научное и практическое значение. Диссертация полностью 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.

Диссертационная работа Агафонова Михаила Олеговича "Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolyomorpha*: молекулярно-генетическая модель для изучения секреции белков и гомеостаза ионов кальция", представленная на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия, заслушана, отзыв на нее заслушан и утвержден на объединенном научном семинаре профильных лабораторий ИМБ РАН 08 сентября 2021 г., протокол №1.

Отзыв на диссертационную работу М.О. Агафонова подготовлен главным научным сотрудником ИМБ РАН Митькевичем Владимиром Александровичем.

Доктор биологических наук
по специальности 03-01-03 – Молекулярная биология,
главный научный сотрудник Федерального
государственного бюджетного учреждения науки
Института молекулярной биологии
им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория конформационного
полиморфизма белков в норме и патологии

В.А. Митькевич

119991, г. Москва, ул. Вавилова 32,
Рабочий телефон +7(499)1359824
e-mail: mitkevich@gmail.com

Подпись В.А. Митькевича заверяю
Ученый секретарь ИМБ РАН, к.в.н.



А.А. Бочаров