

ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертационную работу Агафонова Михаила Олеговича «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.

Одним из важнейших направлений современной биотехнологии является использование различных видов микроорганизмов для продукции рекомбинантных белков. Простые и дешевые системы экспрессии рекомбинантных генов, использующие в качестве организма-хозяина клетки бактерий, не подходят для получения многих белков, востребованных промышленностью и медициной. Это, в частности, относится к секретлируемым белкам человека и животных, поскольку для их правильной укладки и нужных посттрансляционных модификаций требуется прохождение по секреторному пути эукариотической клетки. Способом преодоления этой проблемы может быть использование в качестве хозяев для продукции рекомбинантных белков одноклеточных эукариотических микроорганизмов, таких как дрожжи. Действительно, для производства ряда белков в настоящее время используются различные виды дрожжей, среди которых особое место занимают метилотрофные дрожжи, такие как *Ogataea polymorpha* и *O. parapolyomorpha*, поскольку при их использовании достигаются особенно высокие уровни продукции. Однако возможность получения нужного белка человека и животных в результате его секреции клетками дрожжей является скорее удачей, чем общим правилом, поскольку многие белки оказываются неспособны эффективно секретироваться клетками дрожжей и/или получают нежелательные модификации. Расширение возможностей использования дрожжей в качестве организма-хозяина для продукции рекомбинантных белков требует понимания того, какие особенности секреторного аппарата дрожжей определяют низкую эффективность секреции рекомбинантного белка, какие генетические модификации хозяйского штамма могут увеличить эту эффективность и как такие модификации скажутся на физиологии клеток. На решение этих задач и было направлено диссертационное исследование Агафонова М.О. в приложении к индустриально значимым видам дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolyomorpha*.

Диссертация построена по традиционному плану. Ее основными разделами являются «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты», «Обсуждение», «Заключение» и «Выводы». В конце диссертации приведен список цитированной литературы, включающий 492 ссылки. Диссертация изложена на 244 страницах и содержит 10 таблиц и 69 рисунков. Кроме того в диссертации содержится раздел, включающий список сокращений и генетическую номенклатуру, примененную автором при написании генотипов штаммов дрожжей. Наличие этой информации помогает не знакомому с генетической номенклатурой дрожжей читателю вникать в детали экспериментов, включающих использование штаммов, которые были получены в результате сложных генетических манипуляций.

В разделе «Введение» автор убедительно обосновывает научную и практическую значимость темы исследования, а также причины выбора в качестве объекта исследования метилотрофных дрожжей рода *Ogataea*. В этом же разделе сформулированы цели и задачи диссертационного исследования, его научная новизна и теоретическая и практическая значимость.

Раздел «Обзор литературы» посвящен подробному описанию механизмов секреции белков у эукариот с акцентом на эволюционные различия в этих процессах у разных филогенетических групп организмов. Эти механизмы включают транслокацию белка в просвет эндоплазматического ретикулума, процессы, связанные с контролем его укладки, перемещение белка по секреторному пути, гликозилирование и протеолитический процессинг. Особенный акцент был сделан на роль катионов Ca^{2+} и Mn^{2+} в реализации этих механизмов, а также на механизмы поддержания их гомеостаза в клетке, что было важно для понимания смысла некоторых задач, которые решались в ходе исследования, и результатов ряда экспериментов, приведенных в диссертации.

В разделе «Материалы и методы» описаны методические подходы, использованные в работе, а также штаммы микроорганизмов и плазмиды.

Раздел «Результаты» начинается с описания экспериментов по изучению характеристик секреции клетками дрожжей выбранного в работе модельного белка, активатора плазминогена урокиназного типа (uPA). В частности, было изучено, как влияет количество копий экспрессионной кассеты этого белка на его количество в культуральной среде и внутри клеток. Было показано, что при высокой копийности экспрессионной

кассеты секреция uPA снижается, что сопровождается накоплением неактивного белка внутри клеток в форме высокомолекулярных агрегатов. В экспериментах с мутантными вариантами uPA было показано, что интенсивность внутриклеточной агрегации коррелирует с низкой эффективностью секреции белка. На основании анализа размера гликозидных цепей белка, образующего агрегаты, автор обоснованно делает вывод о том, что эти агрегаты формируются в эндоплазматическом ретикулуме. Таким образом, в этих экспериментах было продемонстрировано, что низкий уровень секреции uPA клетками дрожжей не связан с недостаточным уровнем синтеза этого белка, а вызван проблемами с его укладкой в дрожжевом эндоплазматическом ретикулуме. Это позволило автору использовать uPA в качестве репортера для поиска мутаций, влияющих на укладку белков в секреторном пути дрожжей. В результате идентификация и анализа таких мутаций был выявлен ряд генов, дефекты которых приводят к улучшению условий для укладки uPA в секреторном пути дрожжей рода *Ogataea*. В диссертации охарактеризовано четыре таких гена. Среди них был ген, кодирующий альфа-субъединицу окаймляющего комплекса COP1, а искомый эффект возникал при нарушении С-концевого домена этого белка. У дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* делеция этого домена легальна, поэтому полученный результат демонстрирует преимущество использования в качестве модельного объекта дрожжей рода *Ogataea*. Кроме увеличения эффективности секреции uPA эта мутация вызывала повышенную чувствительность к недостатку кальция в среде, что указывало на роль окаймляющего комплекса COP1 в поддержании гомеостаза кальция в клетке. Это не было известно ранее, и, чтобы выявить возможные механизмы влияния COP1-зависимого везикулярного транспорта на зависимость клеток от доступности кальция в среде, в диссертационной работе Агафонова М.О. были изучены генетические взаимодействия нарушений кальциевых АТФаз клетки с нарушением С-концевого домена альфа-субъединицы COP1. В результате были получены данные, свидетельствующие о наличии пути доставки кальция в секреторные органеллы из источника, независимого от кальциевой АТФазы аппарата Гольджи, и о том, что одним из источников кальция для этого пути может быть основное депо кальция дрожжевой клетки - вакуоль.

В экспериментах по взаимодействию мутаций, влияющих на гомеостаз кальция в клетке, были использованы штаммы с нарушением вакуолярной кальциевой АТФазы *Pmc1*. Изучение свойств этой мутации также вошло в диссертационное исследование М.О.

Агафонова. Было обнаружено, что, в отличие от традиционного модельного молекулярно-биологического объекта исследований *S. cerevisiae*, у дрожжей рода *Ogataea* такая мутация приводит к гиперчувствительности к детергенту, которая подавляется в результате нарушений белков, участвующих в ингибировании перехода клеточного цикла от фазы G2 к митозу. То есть, как и в случае с выявлением роли COP1-зависимого транспорта в поддержании гомеостаза кальция в клетке, обнаружение эффектов нарушения гомеостаза кальция на регуляцию клеточного цикла стало возможным благодаря удачному выбору в качестве модельного объекта дрожжей рода *Ogataea*.

Среди мутаций, увеличивающих эффективность секреции uPA, в диссертационном исследовании Агафонова М.О. были выявлены нарушения гликозилирования белков в секреторном пути. В частности, это было общее снижение гликозилирования в результате снижения синтеза ГДФ-маннозы и специфический дефект O-гликозилирования в результате инактивации гена, кодирующего O-маннозилтрансферазу Pmt1 эндоплазматического ретикулума, катализирующую присоединение к белкам первого маннозного остатка O-связанных гликозидных цепей. Отсутствие у этих мутаций существенных эффектов на снижение жизнеспособности клеток позволило автору сделать вывод о возможности их использования для увеличения продуктивности при создании промышленных штаммов-продуцентов секретируемых белков.

В разделе «Обсуждение» автор проводит подробный анализ полученных в работе экспериментальных результатов, что помогает понять достижения диссертационного исследования, которые коротко суммируются в разделе «Заключение».

В качестве замечаний к работе стоит отметить, что 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 секретируемым 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*. Сделанные замечания не носят принципиального характера и существенно не отражаются на общем положительном впечатлении от работы.

Диссертация Агафонова Михаила Олеговича "Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolyomorpha*: молекулярно-генетическая модель для изучения секреции белков и гомеостаза ионов кальция" является объемным законченным исследованием, имеющим как прикладное, так и фундаментальное значение, и полностью соответствует требованиям п. 9 Положения о порядке присуждения ученых степеней (Постановление Правительства РФ от 24.09.13 №842 в редакции Постановления Правительства от 21.04.2016 г. №335, от 01.10.2018 №1168), предъявляемым к докторским диссертациям, а ее автор заслуживает присуждения ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

12.10.2021

проф. Екатерина Люкманова, д.б.н., г.н.с.
Зав. лабораторией биоинженерии
нейромодуляторов и нейрорецепторов,
Отдел биоинженерии белка,
Институт биоорганической химии
им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова,
Российская академия наук



Подпись Е.Н. Люкмановой заверяю:

Ученый секретарь

Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Институт
биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
Российской академии наук»

