Отзыв

официального оппонента 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

Диссертация М.Ю. Агафонова посвящена выявлению генетических факторов, влияющих на секрецию чужеродных. плохо секретируемых белков клетками метилотрофных дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*, широко использующихся в современной биотехнологии для наработки различных белков, а также определению физиологической роли этих факторов в клетке .

Постранслящионное распределение полипептидов из цитозоля в различные компартменты клетки и их секреция, формирование функционально активных белков лежит в основе всей жизнедеятельности клетки и контролируется различными клеточными транспортными системами. Изучению этих систем модельных микроорганизмов, в частности, дрожжей, посвящено множество работ, но существующие представления о них далеко не полны. Особый интерес к изучению транспортных систем высокотехнологичных дрожжевых клеток связан с развитием генетической инженерии, появлением возможности экспрессии в клетках различных гетерологичных белков, использующихся в различных прикладных целях. Стало важным не просто понимать как осуществляется транспорт этих белков в клетке, но и научиться им управлять, добиваясь их эффективной секреции, необходимой для обеспечения высокой продуктивности дрожжевых штаммов.

В настоящее время обеспечение формирования функционально активных гетерологичных белков и их эффективная секреция является «узким местом» в создании многих промышленных штаммов продуцентов. Особенно, проблемы секреции белков проявляются при попытках максимально повысить экспрессию некоторых клонированных гетерологичных генов.

Диссертационная работа М.О. Агафонова посвящена развитию методических и теоретических подходов для решения этой актуальной проблемы.

Основу работы составляет разработка и использование метода, позволяющего отбирать мутанты дрожжей с повышенной секрецией модельного, функционально активного белка активатора плазминогена человека. Выбор этого белка в качестве модели удачен, т.к. его активность легко тестируется на специальных агаризованных средах, а сам белок представляет интерес для создания фармакологических препаратов.

Значительная часть работы связана с выявлением генов, в которых локализуются полученные мутации, и разработке моделей участия выявленных генов в формировании активного белка и его секреции.

Актуальность работы, ее фундаментальная и потенциальная прикладная ценность хорошо обоснованы в разделе **«Введение»** и не вызывают никаких сомнений.

Раздел **«Обзор литературы»** дает хорошее представление о современном понимании процессов транспорта, формирования активных белков и их секреции в модельных дрожжевых клетках. Автор также детально рассматривает вопросы гомеостаза ионов Ca^{2+} и Mn^{2+}, важные для энергетики транспорта и обсуждения полученных экспериментальных результатов. Раздел хорошо написан и проиллюстрирован, включает упоминание большого количества наиболее важных публикаций за последние десятилетия (более 400) по тематике и, вполне, может использоваться в качестве учебного пособия.

Раздел **«Материалы и методы»** дает представление об использованных в ходе работы разнообразных экспериментальных методиках, штаммах, генетических конструкциях и позволяет сделать вывод о высоком методическом уровне исследований.

В логично построенном разделе **«Результаты»** последовательно описываются этапы работы. В начале работы было установлено, что при увеличении экспрессии белка uPA, при введении соответствующих экспрессионных генетических конструкций, нарушение секреции становится критическим этапом, что N- гликозилирование белка ухудшает секрецию и усиливает агрегацию белка в эндоплазматическом ретикуле. Был также разработан метод оценки эффективности секреции активного белка uPA по зоне лизиса при формировании колоний дрожжей на агаризованной среде с индуктором, содержащей фибрин или при нанесении на эту среду аликвоты культуральной среды.

Эти результаты позволили сформулировать задачи последующих исследований, попробовать разработать метод для выявления генетических факторов, мешающих эффективной секреции белка, а затем попытаться выяснить в каких гена локализуются соответствующие мутации. Этот подход является оригинальным и ключевым для всей работы. Он позволил с довольно высокой частотой (около 1%) выделить значительное количество мутантов с улучшенной секрецией белка. Для отбора вариантов с повышенной секрецией удачным оказалось использование негликозилированного варианта белка с ухудшенной базовой секрецией.

Возможность локализации выделенных мутаций была первоначально ограничена лишь теми мутациями, которые имели дополнительный фенотип, позволяющий проводить контрселекцию при трансформации генетических конструкций, содержащих аллели дикого типа соответствующих генов (из полученных банков дрожжевых генов).

Таким образом были выявлены мутации, улучшающие секрецию модельного белка в 4-х генах. Было установлено, что эффективность укладки uPA в ЭР дрожжей рода *Ogataea* возрастает при нарушении синтеза ГДФ-маннозы (**ген OPU24**), при делеции С-концевого домена α-субъединицы окаймляющего комплекса COPI (ген RET1), при дефекте О-гликозилирования растворимых белков в ЭР(**ген PMT1**) и при инактивации Ca2+/Mn2+ -АТФазы аппарата Гольджи. (ген PMR1**).**

Чтобы иметь возможность определять мутантный локус в отсутствие фенотипов, позволяющих контрселекцию, был использован метод получения мутантов *O. polymorpha* путем случайной интеграции трансформирующей ДНК (линеаризованных плазмид) с последующим отбором колоний, образующих увеличенные зоны лизиса фибрина и локализации интегрированных в геном фрагментов ДНК. У 6 таких мутантов удалось идентифицировать локус интеграции. В двух случаях был нарушен ген VPS10, а в остальных были нарушены гены PEP3, VPS8, VPS17 и VPS35. Все эти гены кодируют белки, которые участвуют в транспортировке белков и липидов между аппаратом Гольджи и вакуолью.

Подученные результаты позволили продемонстрировать эффективность предложенного метода как для отбора мутаций, повышающих эффективность секреции целевого белка, так и для выявления генов, контролирующих различные этапы секреции.

Последующее изучение фенотипов выявленных мутаций позволило сделать научно- значимые выводы о возможной роли соответствующих генов в различных этапах секреции белка, в частности, о роли компонентов, обеспечивающих транспорт белков из аппарата Гольджи в вакуоль на протолитическую активацию секретируемого белка и получить свидетельство о существовании пути доставки Ca2+ в секреторные органеллы из источника, независимого от Ca2+/Mn2+ -АТФазы аппарата Гольджи с участием в этом пути транспорта, осуществляемого при участии компонентов окаймляющего комплекса COPI.

В разделе **«Обсуждение»** для объяснения полученных экспериментальных результатов предлагается ряд интересных научно-значимых моделей механизмов секреции и гипотез, в частности:

- модель для объяснения взаимосвязи агрегации белка uPA и его секреции, а также роли N-гликозилирования как в процессе укладки молекул белка, так и в процессе его выбраковки клеточной системой, контролирующей качество укладки белков .
- возможные механизмы увеличения эффективности секреции uPA у мутантов ret1-27, opu24, pmt1-Δ и pmr1-Δ.

- гипотезы для объяснения фенотипов мутаций, влияющих на секрецию белка, в частности, о роли гомеостаза кальция в чувствительности клеток к SDS и роли вакуоли в доставке кальция в ЭР.

В разделе **«Заключение»** обоснованно говорится об эффективности предложенного подхода для изучения механизмов секреции экспрессируемых в дрожжах гетерологичных белков, позволяющем получить интересные научные результаты и перспективным для использования в ходе создания высокопродуктивных рекомбинантных дрожжевых продуцентов промышленно-ценных белков.

Комментарии 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 КЖ 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.

Заключение

Незначительные замечания не влияют на положительную оценку работы. Диссертация хорошо оформлена и логично изложена. Результаты и положения диссертации опубликованы в 21 статье в международных рецензируемых изданиях и 3 статьях в российских журналах, что свидетельствует о высокой

оценке работ автора профессиональным научным сообществом. Представленная диссертация является законченной научно-квалификационной работой, выполненной на высоком научном и методическом уровне с очевидными перспективами дальнейших исследований в данной актуальной теме. Полученные результаты достоверны, автореферат полностью отражает основные полученные результаты диссертационного исследования.

Таким образом, данная диссертационная работа по уровню теоретической и практической значимости, объему и качеству проведенных исследований, научной новизне и актуальности полностью отвечает всем критериям пунктов 9-14 «Положения о порядке присуждения ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ № 842 от 24 сентября 2013 года с изменениями постановления Правительства Российской Федерации от 21 апреля 2016 г. № 335 «О внесении изменений в Положение о присуждении ученых степеней», а ее автор — Агафонов Михаил Олегович , заслуживает присуждения искомой ученой степени доктора биологических наук по специальности 1.5.4. Биохимия.

Директор Биоресурсного центра –
Всероссийская коллекция промышленных
микроорганизмов (БРЦ ВКПМ), НИЦ «Курчатовский институт» –
ГосНИИгенетика.
д.б.н., профессор Синеокий С.П.
117545, Россия, г. Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1.
Телефон: +7 (495) 314-26-95, e-mail: sineoky@genetika.ru

Подпись С.П. Синеокого заверяю:
Учёный секретарь НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика
к.б.н. Воейкова Т.А.
«11» октября 2021 года