



ФЕДЕРАЛЬНОЕ  
ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ  
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР  
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ  
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2  
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32  
www.fbras.ru, info@fbras.ru

01 ИЮН 2021

№ 85-01-19/494

На №

от

«УТВЕРЖДАЮ»

Директор Федерального  
государственного учреждения  
«Федеральный исследовательский  
центр «Фундаментальные основы  
биотехнологии» РАН  
д. б. н. Федоров А. Н.



## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН на диссертационную работу Агафонова Михаила Олеговича «Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolyomorpha*: молекулярно-генетическая модель для изучения секреции белков и гомеостаза ионов кальция» на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия, выполненную в лаборатории молекулярной генетики института биохимии им. А.Н. Баха Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН.

В 1988 году Агафонов М.О. окончил Биологический факультет Московского Государственного Университета им. М.В. Ломоносова по специальности Биохимия. С 1988 по 2011 работал во Всесоюзном кардиологическом научном центре АМН (в настоящее время ФГУП Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Министерства здравоохранения Российской Федерации). В 1998 году защитил кандидатскую диссертацию «Система «вектор-хозяин» для экспрессии гетерологичных секретируемых белков в клетках дрожжей *Hansenula polymorpha*» по специальности Молекулярная биология (диплом КТ № 053701). С 2011 года поступил на работу в лабораторию молекулярной генетики Института биохимии им. А.Н. Баха РАН, а с 2019 года возглавил группу генной инженерии низших эукариот этого института.

## Актуальность работы

Действующим веществом большого количества фармакологических препаратов, являются белки человека и, как правило, это секретируемые белки. Их получение путем экспрессии в рекомбинантных микроорганизмах – очень важная задача. Однако использование для этих целей дрожжей в качестве организмов-хозяев встречает существенные трудности именно из-за эволюционных отличий от клеток высших эукариот в устройстве секреторного аппарата. Действительно, многие белки, секретируемые клетками млекопитающих, оказываются неспособными принять правильную конформацию в секреторном пути дрожжей. Отличия в протеолитическом процессинге и гликозилировании белков также являются существенной преградой для использования дрожжей при получении рекомбинантных секретируемых продуктов. Современные методы редактирования генома позволяют не только инактивировать «нежелательные» гены организма хозяина, но и вводить «нужные» чужеродные или синтетические гены для создания систем ферментов, обеспечивающих правильную модификацию целевого продукта. Однако для этого требуется понимание того, какие гены организма-хозяина «нежелательные», как их инактивация скажется на физиологии клетки, и каковы могут быть последствия введения новых ферментных систем. Поэтому изучение секреторного аппарата дрожжей, использующихся для получения рекомбинантных белков, может не только расширить представления об устройстве эукариотической клетки, но и открыть новые возможности для индустрии.

Хотя *Saccharomyces cerevisiae* является наиболее изученным и удобным для молекулярно-генетических манипуляций видом дрожжей, со временем стало понятно, что ряд других дрожжей в большинстве случаев оказывается существенно эффективнее для получения рекомбинантных белков. Особое место в этом ряду занимают метилотрофные дрожжи, в частности термотолерантные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolymorpha*. Оба этих вида *Ogataea* активно используются для промышленного получения рекомбинантных белков.

Есть ряд причин, почему метилотрофные дрожжи оказались предпочтительнее *S. cerevisiae* в качестве организма-хозяина для продукции рекомбинантных белков. Это, в частности, наличие сильных регулируемых промоторов, индукция которых не требует дорогих соединений, а также простота получения культур высокой плотности.

Однако, по-видимому, лишь небольшая часть фармакологически важных белков может

быть просто получена путем продукции в не модифицированных клетках дрожжей. Об этом говорит ограниченное количество примеров успешного использования дрожжей для получения секретируемых белков человека, а безуспешные попытки, как правило, не публикуются. При этом усилия многих исследователей направлены на поиск способов модификации секреторного аппарата дрожжей для более эффективной секреции "трудных" белков млекопитающих. В большинстве случаев эти способы основаны на теоретических представлениях о том, что для улучшения укладки белков в дрожжевом секреторном пути требуется увеличение продукции каких-то шаперонов или шапероно-подобных белков. Однако число примеров удачного применения такого подхода весьма ограничено. Для систематического выявления "узких" мест секреции рекомбинантных белков требуется удобная модельная система, позволяющая проводить систематический поиск механизмов, обуславливающих возникновение таких мест, а возможность эффективно влиять на эти механизмы, в существенной степени, зависит от понимания физиологических последствий их нарушения.

**Целью** данной работы было выявление факторов, влияющих на секрецию чужеродных плохо секретируемых белков клетками *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*, а также определение физиологической роли этих факторов.

### **Научная новизна**

В рамках диссертационной работы было продемонстрировано, что активатор плазминогена урокиназного типа (uPA) человека с низкой эффективностью принимает правильную конформацию в секреторном пути дрожжей рода *Ogataea* и при высоких уровнях продукции накапливается в клетках в форме высокомолекулярных агрегатов. Впервые идентифицированы и охарактеризованы мутации *O. polymorpha* и *O. parapolymorpha*, способные увеличивать эффективность секреции рекомбинантных белков за счет улучшения условий для их укладки. Показано, что нарушения гликозилирования белков в секреторном пути дрожжей рода *Ogataea* могут влиять на условия для укладки белков в эндоплазматическом ретикулуме. Впервые продемонстрировано, что с использованием модельной системы, основанной на анализе секреции uPA клетками дрожжей, можно выявлять мутации, нарушающие транспорт белков в вакуоль. Показано, что такие нарушения усиливают протеолитический процессинг секретируемых белков. Впервые было продемонстрировано участие компонента окаймляющего комплекса COP1 в поддержании гомеостаза  $Ca^{2+}$  в секреторных органеллах за счет его доставки из

независимого от  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -АТФазы аппарата Гольджи источника. Этот путь не был описан ранее.

### **Практическая значимость работы.**

Были разработаны подходы для оптимизации продукции секретируемых белков в клетках дрожжей *O. polymorpha* и *O. parapolyomorpha*. 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. В работе было продемонстрировано влияние гомеостаза  $\text{Ca}^{2+}$  на регуляцию клеточного цикла у дрожжей рода *Ogataea*. Были 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. Была 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. parapolyomorpha*.

### **Конкретное личное участие автора в получении результатов**

Все представленные автором результаты были получены им лично или под его руководством. Автор непосредственно участвовал в планировании всех описанных экспериментов и в обсуждении и интерпретации их результатов.

### **Степень достоверности**

Научные положения и выводы диссертации Агафонова М.О. обоснованы и достоверны, и логически вытекают из полученных достоверных экспериментальных данных.

### **Соответствие содержания диссертации специальности, по которой она рекомендуется к защите**

Содержание диссертационной работы и опубликованные по ней материалы соответствуют специальности 03.01.04 Биохимия, результаты диссертационного исследования изложены в опубликованных работах.

## Апробация работы

Материалы работы были представлены на 3 российских и 6 международных конференциях. По материалам диссертации опубликовано 24 статьи в журналах, входящих в Перечень ведущих рецензируемых журналов и изданий ВАК, а также глава в книге.

## Полнота изложения материалов диссертации в работах, опубликованных соискателем ученой степени.

Все приведенные в диссертации данные опубликованы.

### Статьи в рецензируемых научных изданиях, индексируемых Web of Science :

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**:541-551.
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. 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
4. 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
5. **Agaphonov MO**, Packeiser AN, Chechenova MB, Choi ES, Ter-Avanesyan 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.
6. 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.
7. **Agaphonov MO**, Romanova NV, Trushkina PM, Smirnov VN, Ter-Avanesyan MD. 2002. Aggregation and retention of human urokinase type plasminogen activator in the yeast endoplasmic reticulum. *BMC Mol Biol.* **3**:15.
8. **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
9. Kim SY, Sohn JH, Bae JH, Pyun YR, **Agaphonov MO**, Ter-Avanesyan 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.

10. Chechenova MB, Romanova NV, Deev AV, Packeiser AN, Smirnov VN, **Agaphonov MO**, Ter-Avanesyan MD. 2004. C-terminal truncation of alpha-COP affects functioning of secretory organelles and calcium homeostasis in *Hansenula polymorpha*. *Eukaryot Cell* 3:52-60. doi: 10.1128/ec.3.1.52-60.2004.
11. **Agaphonov M**, Romanova N, Sokolov S, Iline A, Kalebina T, Gellissen G, Ter-Avanesyan 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.
12. **Agaphonov MO**, Sokolov SS, Romanova NV, Sohn JH, Kim SY, Kalebina TS, Choi ES, Ter-Avanesyan MD. 2005. Mutation of the protein-O-mannosyltransferase enhances secretion of the human urokinase-type plasminogen activator in *Hansenula polymorpha*. *Yeast* 22:1037-1047.
13. **Agaphonov MO**, Plotnikova TA, Fokina AV, Romanova NV, Packeiser AN, Kang HA, Ter-Avanesyan MD. 2007. Inactivation of the *Hansenula polymorpha* *PMR1* gene affects cell viability and functioning of the secretory pathway. *FEMS Yeast Res.* 7:1145-52.
14. **Agaphonov M**, Romanova N, Choi ES, Ter-Avanesyan M. 2010. A novel kanamycin/G418 resistance marker for direct selection of transformants in *Escherichia coli* and different yeast species. *Yeast* 27:189-95.
15. Fokina AV, Sokolov SS, Kang HA, Kalebina TS, Ter-Avanesyan MD, **Agaphonov MO**. 2012. Inactivation of *Pmc1* vacuolar  $Ca^{2+}$  ATPase causes  $G_2$  cell cycle delay in *Hansenula polymorpha*. *Cell Cycle.* 11:778-784.
16. 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.
17. **Agaphonov M**, Alexandrov A. 2014. Self-excising integrative yeast plasmid vectors containing an intronated recombinase gene. *FEMS Yeast Res.* 14:1048-1054.
18. 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.
19. 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.
20. 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  $Ca^{2+}$  in *Hansenula polymorpha*. *PLoS One.* 10:e0145915.
21. Karginov A, **Agaphonov M**. 2016 A simple enrichment procedure improves detection of membrane proteins by immunoblotting. *Biotechniques.* 61:260-261.

22. **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.
23. 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.
24. 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.

#### **Глава в книге.**

Kang HA, Sohn JH, **Agaphonov MO**, Choi ES, Ter-Avanesyan 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.

#### **Рекомендуемые оппоненты:**

**Синецкий Сергей Павлович** – доктор биологических наук, профессор, директор Национального биоресурсного центра – 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).

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

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

#### **Рекомендуемая ведущая организация**

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук.

Диссертация «Метилотрофные дрожжи *Ogataea polymorpha* и *O. parapolyomorpha*: молекулярно-генетическая модель для изучения секреции белков и гомеостаза ионов кальция» Агафонова Михаила Олеговича на основании проведенного семинара рекомендуется к защите на соискание ученой степени доктора биологических наук по специальности 03.01.04 Биохимия.

Заключение принято на заседании совместного семинара лаборатории молекулярной генетики, группы генной инженерии низших эукариот, группы белок-белковых взаимодействий, лаборатории биоэнергетики, лаборатории экологической и эволюционной биохимии, лаборатории биохимии стрессов микроорганизмов, лаборатории инженерной энзимологии, лаборатории биотехнологии ферментов, лаборатории молекулярной биотехнологии, лаборатории иммунобиохимии, лаборатории структурной биохимии белка, лаборатории физической биохимии Института биохимии им. А.Н. Баха и группы генетической инженерии грибов Института биоинженерии Федерального государственного учреждения "Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии" Российской академии наук" путем открытого голосования. Присутствовало на семинаре – 30 человек. Результаты голосования: «за» - 30 человек, «против» - нет, «воздержалось» - нет. Протокол №3 от 14 мая 2021 г.

*Председатель совместного семинара лабораторий,*  
заведующий лабораторией  
биохимии стрессов микроорганизмов,  
доктор биологических наук, профессор

А.С. Капрельяни  
Подпись Капрельяни А.С.  
ЗАВЕРЯЕТСЯ  
02 06 2021 г.

*Секретарь,*  
младший научный сотрудник  
группы генной инженерии низших эукариот

А.В. Каргинов

21 мая 2020 года

Подпись Каргинова А.В.  
ЗАВЕРЯЕТСЯ  
02 06 2021 г.