

ОТЗЫВ

официального оппонента

на диссертационную работу **СОФЬЯНОВИЧ Ольги Александровны**
«Изучение генетических основ синтеза γ -глутамильных ди- и трипептидов в *Saccharomyces cerevisiae* на примере γ -глутамил-валина и γ -глутамил-валил-глицина»,

представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук
по специальности 03.02.07 – генетика

В диссертационной работе Софьянович О.А. проведено изучение основ генетики синтеза γ -глутамильных пептидов, γ -глутамил-валина и γ -глутамил-валил-глицина (далее γ -EVG и γ -EV), в дрожжах *S. cerevisiae*, с целью создания возможности разработки биотехнологического процесса получения этих веществ. С этими целями разработана методика эффективного конструирования штаммов *S. cerevisiae*, удовлетворяющих требованиям генетической безопасности для пищевой промышленности, и получен ряд штаммов с изменёнными путями синтеза γ -глутамил-валина и γ -глутамил-валил-глицина. В этих штаммах биосинтез указанных веществ изучен в условиях различных комбинаций веществ-предшественников, и, также, изучены связанные с синтезом процессы транспорта и деградации этих веществ в клетке.

Актуальность темы исследования.

Тема исследования актуальна в связи с тем, что исследуемые в работе γ -EVG и γ -EV принадлежат к большой группе веществ, определяющих вкус пищевых продуктов - γ -глутамильных ди- и трипептидов. Соответственно, такие вещества используются или могут быть использованы в качестве улучшающих вкус пищевых добавок. Что касается конкретно γ -глутамил-валина и γ -глутамил-валил-глицина, то автор выбрал их в связи с новыми данными об их повышенной, по сравнению с известными пептидами, активности в активации человеческих рецепторов, вовлечённых во вкусовое восприятие. Очевидно, что разработка методов биотехнологического получения γ -глутамильных пептидов является актуальной задачей для создания здоровых продуктов питания и диетических продуктов.

Второй аспект актуальности работы связан с тем, что, для решения основных задач исследования, автор разработал инструментарий для эффективной и прецизионной замены промоторов генов в хромосоме *S. cerevisiae*. В связи со сложностью эффективного редактирования генома дрожжей, развитие методов модификации их геномов остается актуальной темой. В случае представленной работы, особое значение метода заключается в том, что конечные штаммы, полученные этим методом, не содержат чужеродной ДНК, что делает их

соответствующими требованиями, предъявляемым в развитых странах к штаммам, используемым в пищевой промышленности.

Структура диссертации.

Структура диссертации Софьянович О.А. соответствует сложившимся требованиям к структуре таких работ, и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Выводы» и «Список литературы». Работа изложена на 131 странице, содержит 29 рисунков и 15 таблиц.

В разделе «Введение» отмечена актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, разъяснены научная новизна и практическая значимость цели и задач работы.

Раздел «Обзор литературы» описывает текущий уровень знаний в ряде областей биологии, связанных с темой диссертационной работы. В частности, подробно изложена роль глутатиона в клетке и связь его синтеза с синтезом γ -EVG и γ -EV, описано строение γ -глутамильных пептидов и источники, в которых они были найдены; приведена информация о путях биосинтеза таких пептидов и генетике этих процессов; достаточно детально описаны свойства ферментов, которые способны синтезировать эти пептиды *in vivo* и *in vitro*; описан метаболизм глутатиона в различных организмах и строение и субстратная специфичность ферментов, участвующих в этом процессе. В соответствии с практической направленностью работы, рассмотрена роль γ -глутамильных пептидов в формировании вкуса пищевых продуктов. В главе «Особенности конструирования штаммов *S. cerevisiae* для пищевой промышленности» проведён обзор требований, предъявляемых к штаммам продуцентам для пищевой промышленности и способов конструирования штаммов, не содержащих в хромосоме т.н. «швов» после клонирования, а также чужеродной ДНК.

Глава «Материалы и методы» содержит достаточно подробное описание методов, использованных в работе, которое содержит и ссылки на оригинальные работы, в которых были разработаны указанные методики.

В главе «Результаты и обсуждение» приведены и проанализированы результаты проведенных экспериментов.

Глава состоит из 4-х разделов. Первый раздел описывает создание инструментария для многократной замены промоторов целевых генов в *S. cerevisiae*. Метод позволяет создавать штаммы, не содержащие чужеродной ДНК. Кроме того, в этот раздел автор поместил результаты, подтверждающие, что пептиды γ -EVG и γ -EV образуются

S. cerevisiae de novo, а добавление предшественников в среду культивирования

увеличивает накопление этих пептидов в клетках, в соответствии с предположенными автором путями их синтеза.

Во втором разделе описывается идентификация генов, отвечающих за синтез γ -EVG и γ -EV из различных предшественников.

Третий раздел описывает образование γ -EVG при усилении экспрессии генов биосинтеза глутатиона.

В четвертом разделе приведены результаты по идентификации гена, кодирующего транспортер, отвечающий за импорт γ -EVG в клетки *S. cerevisiae*.

В главе «Выводы» суммированы результаты исследования.

Степень достоверности результатов и обоснованности выводов, сделанных автором, а также научная новизна и практическая значимость исследования.

Во-первых, в рамках работы Софьянович О.А. сконструирован интересный инструментарий для замены промоторов целевых генов в *S. cerevisiae*. Особенность задачи автора была в том, что, в отличие от аналогичного подхода для делеции или замены генов, здесь необходима высокая точность вставки, т.к. новый промотор должен правильно соединиться с имеющимся геном. Разработанный Ольгой подход, приводящий сначала к пристройке к хромосомному гену промотора, нарушенного маркером для селекции URA3, а затем удалению маркера и восстановлению работоспособного промотора, обеспечивает такую точность. Также, достоинство метода заключается в том, что конечные штаммы не содержат чужеродной ДНК. Эта часть работы является хорошим примером того, как ранее известный механизм применен для решения новых задач. Представляется, что предложенный автором метод будет интересен для метаболической инженерии дрожжей, и, при дальнейшем развитии, для исследований других организмов. Автор продемонстрировал пригодность метода для многократной замены промоторов в одном штамме.

Во-вторых, в результате проведенных автором экспериментов, идентифицированы гены, критические для синтеза пептидов γ -EVG и γ -EV из различных предшественников. В совокупности с тем, что основные реакции, осуществляемые ферментами, кодируемыми этими генами, уже известны, результаты, полученные автором, вполне обоснованно указывают на то, что γ -глутамильные ди- и трипептиды могут образовываться в *S. cerevisiae* несколькими путями, а именно, как побочные продукты синтеза глутатиона и как продукты его деградации. Такое исследование для *S. cerevisiae*, как и для дрожжей вообще, проведено впервые. Кроме того, эксперименты, проведенные автором, указывают на то, что комплекс (Dug2-Dug3)₂, ранее идентифицированный как ферментативный комплекс иницирующий деградацию глутатиона в цитоплазме путем отщепления γ -глутамильной группы, способен переносить γ -глутамильную группу на пептиды и аминокислоты (VG и валин). Это первое указание на наличие γ -глутамилтрансферазной активности у этого

комплекса. Также результаты автора, указывающие на способность пептидазы, кодируемой геном *DUG1* расщеплять дипептид VG, и способность транспортера, кодируемого геном *OPT1* импортировать γ -EVG в клетку, получены впервые.

Говоря о практической значимости исследования, можно заключить, что, автором получены данные, позволяющие выбрать направления исследований для создания продуцентов γ -глутамильных пептидов на базе *S. cerevisiae* и получены результаты, уточняющие свойства ферментов деградации глутатиона.

Опубликование результатов диссертации

Результаты и выводы диссертационной работы Софьянович О.А. представлены в печатных работах – двух статьях, опубликованных в специализированных рецензируемых зарубежных журналах, включенных в систему цитирования Web of Science (Molecular Biotechnology и PLOS One), и одном патенте на изобретение РФ (Официальный бюллетень Роспатента).

Замечания к работе.

К работе сформированы следующие замечания:

1) В структуре обзора литературы присутствуют недочёты в структурированности подачи материала, например:

- подраздел 2.1.4.2. начинается с описания судьбы в клетке путресцина, не упоминавшегося в предыдущих разделах, что затрудняет восприятие материала этого раздела.

- сведения раздела 2.3 явно относятся к той же теме, что и сведения в подразделе 2.1.4.2, но автор не поясняет в тексте, почему эти разделы расположены отдельно. Также, раздел 2.3 начинается со слов «Из сказанного выше видно, что многие γ -глутамильные соединения образуются ферментами метаболизма GSH», хотя из непосредственно предшествующего ему текста это не очевидно.

2) В разделе 2.7 недостаточно полно описана методика замены генов с помощью URA3-ФОА – в результате, из дальнейшего изложения в разделе 4.1 «Результатов» только узким специалистам понятно, в чём именно новизна результата по разработке методики редактирования генома.

3) В разделе 2.7 автор не поясняет, что означает термин «бесшовное удаление генов», и для чего нужно такое удаление.

4) На рисунках 2, 3, 8 и 9 в Обзоре литературы пояснения приведены по-английски. Несмотря на то, что эти рисунки воспроизведены из оригинальных англоязычных работ, правильнее было бы привести эти пояснения на русском языке.

Заключение.

Диссертация Софьянович О.А. является завершённой работой, выполненной на хорошем методическом уровне с использованием всех необходимых современных молекулярно-генетических методов; ее содержание полностью соответствует всем

требованиям, представленным в «Положении о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N 842 (ред. от 01.10.2018 г., с изм. от 26.05.2020 г.).

Достоверность результатов, полученных автором в рамках проведенных исследований, не вызывает сомнений. Выводы, сделанные автором, адекватны поставленным целям и полученным результатам. В целом, приведённые замечания не снижают уровня и значимости работы Софьянович О.А.

Автор диссертационной работы заслуживает присуждения искомой кандидата биологических наук по специальности 03.02.07 – генетика.

Лавров Константин Валерьевич



кандидат биологических наук, начальник лаборатории Молекулярной биотехнологии Национального исследовательского центра «Курчатовский институт – ГосНИИгенетика»

117545, г. Москва, 1-й Дорожный пр., д. 1,

Тел.: +7 (495) 315-01-83,

электронная почта: lavrov.ko@gmail.com

26.02.2021 года

Подпись Лаврова К.В. удостоверяю:

