

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

Актуальность темы исследования.

Основная часть работы Софьянович О.А. посвящена изучению генетических основ синтеза γ -глутамильных пептидов в *S. cerevisiae*. Выбранная автором тема представляется имеющей безусловное практическое значение, исходя из того факта, что многие представители этого класса соединений определяют вкус пищевых продуктов и, таким образом, могут быть использованы в качестве натуральных пищевых добавок. Более того, некоторые из этих соединений являются натуральными усилителями вкуса. Таким образом, развитие методов биологического производства γ -глутамильных пептидов открыло бы новые возможности для пищевой промышленности в области создания здоровых продуктов питания и диетических продуктов.

Кроме чисто практического значения, работа имеет еще несколько интересных аспектов более фундаментального характера. Во-первых, как показано автором в обзоре литературы и, как следует из результатов полученных автором, во многих случаях γ -глутамильные пептиды образуются в клетках в процессах связанных с синтезом и деградацией глутатиона. Таким образом, изучение образования γ -глутамильных пептидов приносит информацию об одном из ключевых процессов, протекающих в эукариотической клетке. Кроме того, работу можно рассматривать как один из примеров изучения явления, которое, иногда называют «скрытым метаболизмом» - образованием метаболических путей, обусловленным способностью ферментов использовать альтернативные субстраты. Это явление играет значительную роль, как для функционирования самих клеток, так и для биотехнологии, позволяя значительно расширить спектр веществ, получаемых биосинтезом.

Помимо исследования генетических основ синтеза γ -глутамильных пептидов, часть работы Софьянович О.А. посвящена созданию инструментария для замены промоторов целевых генов в *S. cerevisiae*. Развитие методов модификации геномов, даже для таких исследованных организмов как *S. cerevisiae* всегда остается актуальной темой. В случае

представленной работы, особое значение метода заключается в том, что конечные штаммы, полученные этим методом, не содержат чужеродной ДНК.

Структура диссертации.

Диссертация Софьянович О.А. имеет традиционную структуру и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения», «Выводы» и «Список литературы (268 источников)». Работа изложена на 131 странице, содержит 29 рисунков и 15 таблиц.

В разделе «Введение» отражена актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, показана научная новизна и практическая значимость.

Раздел «Обзор литературы» описывает современное состояние областей биологии, имеющих непосредственное отношение к теме проведенного автором исследования. В частности, описана биологическая роль глутатиона, описано строение γ -глутамильных пептидов и источники в которых они были найдены; описаны биологические процессы в которых образуются эти пептиды; 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. Также рассмотрена роль γ -глутамильных пептидов в формировании вкуса пищевых продуктов. В главе «Особенности конструирования штаммов *S. cerevisiae* для пищевой промышленности» рассмотрены требования, предъявляемые к штаммам продуцентам для пищевой промышленности и применяемые подходы к конструированию штаммов, не содержащих чужеродной ДНК.

Глава «Материалы и методы» содержит полное описание методов применявшихся для выполнения данной работы и даны ссылки на источники использованных методик.

В главе «Результаты и обсуждения» 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 в *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. cerevisia*.

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*. Основная ценность 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, кодируемых 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.

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК, 1 патент на изобретение.

Замечания к работе.

Принципиальных замечаний к работе нет. Минорные замечания следующие:

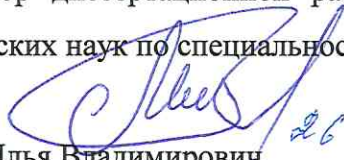
1. В разделе цели и задачи неудачная формулировка: «Создание инструментария для многократной замены промоторов целевых генов для получения штаммов *S. cerevisiae*, не содержащих чужеродной ДНК». Смена промоторов не может привести к отсутствию чужеродной ДНК. Возможно, лучше было бы написать: «инструментарий для точного редактирования генома с точностью до нуклеотида» или в более частном виде: «замена промоторов собственных генов *S. cerevisiae*, промоторами других генов *S. cerevisiae* для усиления транскрипции этих генов, таким образом, чтобы в конечном штамме не было фрагментов ДНК другого организма».
2. Подробное описание структуры глутатион синтетазы в обзоре литературы не снабжено иллюстрацией.
3. Не хватает описания в обзоре литературы, почему клетки *URA3+* погибают от 5-ФОА.
3. Некоторые предложения не согласованы. Например: «ПЦР проводилась на амплификаторе с использованием ДНК полимераз...». Ссылки в тексте на некоторые рисунки не совпадают, пример: «плазида рKS-*URA3-PADH1-L,R* (Рисунок 1)», на самом деле рис 13.
4. Из материалов и методов и из 1 главы результатов остаётся не ясно, какой должна быть длина плеча справа от вставки. Если для правого плеча достаточно 40 н.п., то почему «upstream» плечо взято более длинным?
5. Измерение активности Gsh2 в табл. 12 приведено без расчёта стандартного отклонения. Померено один раз? Также и в табл. 15 для Gsh1.

Заключение.

Диссертация Софьянович О.А. является завершённой работой, выполненной на высоком методическом уровне с использованием 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.

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


26.02.2021

Манухов Илья Владимирович

доктор биологических наук,

профессор кафедры биофизики Физтех-школы физики и исследований им. Ландау МФТИ, заведующий лабораторией молекулярной генетики, главный научный сотрудник МФТИ
Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Московский физико-технический институт (государственный университет)» (МФТИ)

141701, Московская область, г. Долгопрудный, Институтский переулок, д.9.

Юридический адрес: 117303, г. Москва, ул. Керченская, д.1 «А», корп. 1

Телефон: +7(905)562-29-24; +7 (495) 408-45-54

E-mail: manukhovi@mail.ru, info@phystech.edu; info@mipt.ru

сайт: www.mipt.ru

Подпись д.б.н. Манухова И.В. заверяю,

Ученый секретарь МФТИ

Кандидат физико-математических наук, доцент

Е.Г. Евсеев

