



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

26.02.2021 № 85-01-19/198

«Утверждаю»

Заместитель директора по научной  
работе

26.02.2021 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ  
на диссертационную работу соискателя  
**Софьянович Ольги Александровны**

**«Изучение генетических основ синтеза  $\gamma$ -глутамильных ди- и трипептидов в  
*Saccharomyces cerevisiae* на примере  $\gamma$ -глутамил-валина и  $\gamma$ -глутамил-валил-  
глицина»,**

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

Диссертационная работа Софьянович О.А. посвящена поиску генов, отвечающих за образование  $\gamma$ -глутамильных пептидов в *S. cerevisiae* и созданию генетического инструментария для замены промоторов целевых генов с целью получения штаммов *S. cerevisiae*, не содержащих чужеродной ДНК.

#### **Актуальность работы**

В настоящее время к  $\gamma$ -глутамильным соединениям появился особо высокий интерес в связи с их участием во вкусовой рецепции. Использование  $\gamma$ -глутамильных пептидов в качестве усилителей вкуса позволит уменьшить количество жиров и соли без значительной потери вкусовых свойств пищи. Использование *S. cerevisiae* в качестве штамма-продуцента таких пептидов выглядит перспективно, так как экстракт этих дрожжей широко применяется в качестве вкусовой добавки. Помимо практического

значения, изучение биосинтеза  $\gamma$ -глутамильных пептидов позволяет получить новую информацию о свойствах ферментов, участвующих в метаболизме глутатиона, так как часто эти соединения образуются в живых тканях как побочные продукты метаболизма глутатиона.

### **Структура и содержание работы**

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждения», «Выводы» и «Список литературы». Во введении сформулированы актуальность, цели и задачи работы, обозначены научная новизна и практическая значимость. Глава «Обзор литературы» состоит из 7 разделов и подробно описывает строение и распространение  $\gamma$ -глутамильных пептидов; разнообразие, строение и субстратную специфичность ферментов, участвующих в процессе их синтеза и деградации, а также особенности конструирования штаммов *S. cerevisiae* для пищевой промышленности. Глава «Материалы и методы» содержит полное описание методов молекулярной генетики, биохимии, микробиологии, аналитической химии, применявшихся при выполнении данной работы. Глава «Результаты и обсуждения» состоит из 4 разделов. Первый раздел содержит описание создания генетического инструментария для многократной «бесшовной» замены промоторов целевых генов *S. cerevisiae* и подтверждение того, что  $\gamma$ -EVG и  $\gamma$ -EV образуются в *S. cerevisiae de novo*, а добавление предшественников в среду культивирования увеличивает накопление  $\gamma$ -EV и/или  $\gamma$ -EVG в соответствии с предполагаемыми путями их синтеза. Во втором разделе проводится идентификация генов, отвечающих за синтез  $\gamma$ -EVG и  $\gamma$ -EV из предшественников валина, глицина,  $\gamma$ -EV и VG, в том числе были изучены факторы, влияющие на образование  $\gamma$ -EVG из VG. Третий раздел описывает образование  $\gamma$ -EVG при усилении экспрессии генов биосинтеза глутатиона. В четвертом разделе приведены результаты по идентификации импортера  $\gamma$ -EVG. В разделе «Выводы» сформулированы основные выводы исследования, соответствующие поставленным задачам.

Работа изложена на 131 странице, содержит 29 рисунков и 15 таблиц. Библиографический указатель содержит 268 источников.

### **Научная новизна и практическая значимость исследования**

В рамках настоящей диссертационной работы Софьянович О.А. был создан генетический инструментарий, позволяющий проводить многократную «бесшовную» замену промоторных областей целевых генов *S. cerevisiae*. Также были изучены пути биосинтеза  $\gamma$ -глутамильных трипептидов, аналогов глутатиона, в клетках *S. cerevisiae*, на

примере трипептида  $\gamma$ -EVG, обладающего ценными вкусовыми свойствами. Продemonстрировано, что за образование  $\gamma$ -EV и  $\gamma$ -EVG в клетках *S. cerevisiae* отвечают гены биосинтеза и деградации глутатиона. Следует отметить, что данные, указывающие на то, что комплекс (Dug2-Dug3)<sub>2</sub> участвует в переносе  $\gamma$ -глутамильной группы на валин и дипептид валил-глицин, являются первыми экспериментальными указаниями на наличие  $\gamma$ -глутамилтрансферазной активности у этого комплекса *in vivo*. Кроме того продемонстрировано, что ген *DUG1*, ранее охарактеризованный как ген, кодирующий пептидазу, специфичную к цистеинил-глицину, отвечает за деградацию дипептида VG. Продemonстрировано, что ген *HGT1*, кодирующий импортер олигопептидов и глутатиона, отвечает за транспорт  $\gamma$ -EVG внутрь клетки. Оценен потенциал образования  $\gamma$ -EVG у *S. cerevisiae* в результате сверхэкспрессии генов синтеза глутатиона, *GSH1* и *GSH2*.

Однако, несмотря на высокий научный и методический уровень, работа не лишена определенных недостатков, а ряд проведенных экспериментов и интерпретация их результатов вызывают вопросы.

Во Введении и Разделе 2.2. Обзора Литературы автор делает акцент на вкусовых свойствах  $\gamma$ -глутамильных пептидов, способных разнообразить рацион при диетах и уменьшить количество жиров и соли без значительной потери вкусовых свойств пищи. Однако, с учетом выбора в качестве целевых пептидов тех из них, что содержат глутамат и валин, автору следовало бы уделить внимание следующим моментам. Глутаминовая кислота является прямым предшественником значимых нейромедиаторов, таких как 4-гидрокси- и аминокислоты. В результате, регулярное потребление соответствующего соединения ведет, как известно, к привыканию. Также, автору следовало бы уделить пару слов потенциальному канцерогенному действию разветвленных аминокислот (валин), при их принудительном введении в рацион питания человека.

В подпункте 3.5. раздела «Материалы и Методы» автор приводит описание процедуры инактивации генов в целевых штаммах с использованием модуля *PADH1-kanR*. Генетическая конструкция, содержащая соответствующий модуль, не приведена в Таблице 11. Возможно, Автору следовало бы более подробно детализировать метод, использованный для делеции выбранных генов.

В тексте диссертационной работы, также как и в автореферате, автор постоянно некорректно использует фразеологизм “ферментация штамма”. Ферментация (брожение), - это процесс утилизации клетками доступного углеродного субстрата, более того, предпочтительно протекающий в анаэробных условиях, а отнюдь не способ характеристики того или иного штамма выбранного микроорганизма.

На стр. 85 на рисунке 19 проиллюстрировано влияние повышенной экспрессии транспортера дипептидов PTR2 на накопление  $\gamma$ -EVG и VG. Как и следовало ожидать, уровень продукции  $\gamma$ -EVG повысился в несколько раз, но одновременно снизилось содержание дипептида VG, который должен был более эффективно импортироваться в клетку. Четкого объяснения автор не приводит, отмечая, что такой результат «косвенно указывает на деградацию дипептида в клетках». Возможно это и так, но почему деградация VG настолько усиливается, что, несмотря на усиление его импорта, конечная концентрация VG снижается? Что индуцирует такую деградацию?

На стр. 91 представлены результаты анализа продукции  $\gamma$ -EVG в штамме PADH1-PTR2 *dug2* $\Delta$  с делецией гена DUG2, свидетельствующие о том, что в среде SD с добавлением VG накопление  $\gamma$ -EVG не происходило (Рисунок 22). Из этого наблюдения автор делает вывод о том, что образование  $\gamma$ -EVG из VG осуществляется в основном благодаря комплексу белков (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>, который следовательно обладает  $\gamma$ -глутамилтрансферазной активностью. Однако, влияние второго гена, DUG3, не исследовали. Возможно, он и не важен. Было бы логично создать и проанализировать штамм, в котором он делетирован. Откуда вообще известно, что такой комплекс существует? Аналогичный вопрос и к описанному на стр. 93 эксперименту со штаммами с инактивированными генами ECM38 и DUG2, из которого делается вывод о том, что синтез  $\gamma$ -EV осуществляется и *Ecm38*, и комплексом (Dug2-Dug3)<sub>2</sub>.

Также вызывает вопрос заключение и автора о том, что «поскольку одиночные делеции ECM38 и DUG2 не влияли на уровень  $\gamma$ -EV, можно предположить, что при достижении определенной внутриклеточной концентрации дипептида, начинается его деградация». Как может деградация начинаться только после достижения какой-то пороговой концентрации? Скорее результаты этого эксперимента указывают на то, что функции ECM38 и DUG2 в этом процессе являются взаимозаменяемыми.

В эксперименте по анализу синтеза  $\gamma$ -EVG при усилении экспрессии генов биосинтеза GSH автор обнаружил неполную конверсию  $\gamma$ -EV в  $\gamma$ -EVG даже при амплификации гена GSH2 под конститутивным промотором, и объясняет это тем, что белок Gsh2 имеет невысокую субстратную специфичность к  $\gamma$ -EV. Во-первых, логично было бы сделать сверхэкспрессию не обоих генов (GSH1 и GSH2) а только GSH2, чтобы не накапливать слишком много промежуточного продукта. Во-вторых, неполная конверсия может объясняться не низкой специфичностью, а просто малым количеством белка Gsh2 в клетке вследствие его быстрой деградации или неэффективного синтеза.

Имеются также недостатки в оформлении работы. На Рис. 16 при добавлении валина в области столбика с  $\gamma$ -EVG нет вообще ничего. Возможно, содержание  $\gamma$ -EVG

падает так сильно, что не детектируется. Но тогда лучше подписать пустой столбик как «н.д.» (не детектируется). Цветовая схема стрелок на Рис. 15, 18, 23 и 27 хуже воспринимается, чем обычные черные стрелки в оригинальных рисунках статьи, опубликованной в журнале PLoS One. 14(5): e0216622.

Высказанные замечания не являются принципиальными, в основном носят дискуссионный характер и не снижают общей высокой оценки работы.

### **Заключение**

Диссертация Софьянович О.А. является завершенной 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.

По теме диссертации опубликовано 3 печатные работы, из них 2 в журналах, рекомендованных ВАК, 1 патентная заявка.

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

Отзыв обсужден и утвержден на Межлабораторном семинаре ФИЦ Биотехнологии РАН 26 февраля 2021г. (Протокол №1).

Доктор биологических наук Марданов Андрей Владимирович



26.02.21

### **Сведения о составителе отзыва:**

Марданов Андрей Владимирович, доктор биологических наук, главный научный сотрудник лаборатории геномики микроорганизмов и метагеномики Федерального государственного учреждения «Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2

Тел: +7 (499) 783-32-64

e-mail [mardanov@biengi.ac.ru](mailto:mardanov@biengi.ac.ru)

*Горюхи*  
Марданова Андрея Владимировича удостоверяю

Ученый секретарь ФИЦ Биотехнологии РАН  
к.б.н. Орловский А.Ф.

