

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертацию Кислицина Валерия Юрьевича “Роль транскрипционных факторов в биосинтезе целлюлаз мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*”, представленную на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология»

Актуальность темы исследований. Целлюлолитические ферменты широко применяются в сельском хозяйстве, пищевой, целлюлозно-бумажной и текстильной промышленности, производстве моющих средств, а также используются при переработке отходов. Потребности в эффективных гидролитических ферментах ежегодно растут, что обуславливает необходимость создания высокоэффективных и стабильных микробных продуцентов с высокой целлюлолитической активностью и биотехнологий на их основе.

Одним из важных направлений на пути создания промышленных штаммов – продуцентов гидролитических ферментов является изучение регуляции их биосинтеза. Однако, системы регуляции транскрипции генов ключевых целлюлаз у мицелиальных грибов изучены крайне недостаточно. В этой связи, актуальность диссертационного исследования В.Ю. Кислицина, посвященного исследованию механизмов регуляции транскрипции генов, кодирующих целлюлолитические ферменты, у одного из наиболее эффективных продуцентов – мицелиального гриба *Penicillium verruculosum* (syn. *Talaromyces verruculosus*) В1-537, не вызывает сомнений.

Цель и задачи, поставленные в работе, в целом, соответствуют современным тенденциям развития биотехнологии.

Степень достоверности и апробация результатов. Достоверность полученных результатов диссертационного исследования подтверждена их верификацией с использованием различных современных методов молекулярной биологии, биохимии, биоинформатики, биотехнологии, характеризующихся высокой специфичностью и воспроизводимостью и

выполненных на современном оборудовании. Результаты работы опубликованы в рецензируемых российских и международных изданиях, обнародованы на российских научных конференциях. В целом, достоверность результатов исследования, степень обоснованности положений и выводов, сформулированных в диссертации, не вызывают сомнений.

Научная новизна.—В данной работе впервые адаптирована методика геномного редактирования с применением системы CRISPR-Cas9 для направленного нокаута генов мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*. Диссертантом определены нуклеотидные последовательности генов, кодирующих транскрипционные факторы *Ctrl*, *Clr2*, *XlnR*, *TacA*, и продемонстрирована связь изменения их экспрессии с активностью секретируемых ферментов целлюлолитического комплекса.

Теоретическая и практическая значимость работы. Методика направленного редактирования генома на основе бактериальной системы CRISPR-Cas9, адаптированная в данной работе для *Penicillium verruculosum*, может быть использована для других мицелиальных грибов. Получены новые усовершенствованные продуценты ценных целлюлолитических ферментов, обладающие повышенной целлобиогидролазной и целлобиазной активностями. Разработан ферментный препарат, обладающий более высокой в сравнении с ранее полученными, гидролитической активностью в отношении карбоксиметилцеллюлозы, и имеющий хорошие перспективы практического применения.

Содержание и структура диссертационной работы

Диссертация написана по общепринятому плану и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследований, результатов экспериментов и их обсуждения, заключения, выводов, списка цитированной литературы и приложений.—Работа изложена на 121 странице, содержит 48 рисунков, 25 таблиц и 6 приложений. Список литературы включает 193 источника, 5 источников являются самоцитированием.

В главе «Введение» обосновывается актуальность выбранной темы, представлены цель, задачи, обозначены научная новизна, практическая и теоретическая значимость работы, сформулированы положения, выносимые на защиту, личный вклад соискателя, указан объем и структура диссертации и количество печатных материалов, опубликованных по теме диссертации.

Обзор литературы (Глава 2) состоит из 4 основных разделов. В обзоре приводятся данные о механизмах регуляции генов карбоангидраз у мицелиальных грибов, способах повышения продуктивности штаммов мицелиальных грибов – продуцентов гидролитических ферментов, известных методах редактирования геномов мицелиальных грибов и системах редактирования геномов – CRIPSR-Cas9. В конце обзора дается краткое заключение, обобщающее изложенные данные.

В целом, литературный обзор дает представление о современном состоянии исследований в изучаемой области и обосновывает актуальность и основные направления исследований. Мне не хватило в обзоре обоснования выбора основного объекта исследования – мицелиального гриба *Penicillium verruculosum*, а также сведений, касающихся открытия штамма и его применения, преимуществ использования именно этого гриба в качестве промышленного продуцента карбоангидраз, и его сравнения с другими известными в мире производственными штаммами.

В Главе “Материалы и методы” (Глава 4) подробно описаны методы, использованные в работе. Методы в целом адекватны поставленной цели и задачам исследования и включают большой арсенал современных методов молекулярной биологии, биохимии и биотехнологии. В качестве небольшого замечания по этой части можно отметить отсутствие раздела, характеризующего статистическую обработку данных.

Результаты исследований и их обсуждение изложены в Главе 5. Результаты изложены в порядке, в целом, соответствующем целям и задачам исследования, что является логичным и удобно для чтения и понимания.

Представлены данные по редактированию генома *P. verruculosum* с помощью CRISPR-Cas9, включая создание генетических конструкций и проверку действенности данного подхода на примере экспрессии гетерологичной глюкозооксидазы, получение штаммов с нокаутами генов целлобиогидролазы (*cbh1*) и нитратредуктазы (*niaD*). Остальные разделы работы посвящены изучению механизма активации гена *cbh1*, влияния отдельных транскрипционных факторов (Clr1, Clr2, XlnR, TacA) на транскрипцию генов, кодирующих ферменты целлюлолитического комплекса.

В заключении автор обобщает полученные результаты. Завершается диссертация выводами, которые в целом обоснованы, соответствуют цели и задачам диссертационного исследования.

Автореферат адекватно отражает содержание диссертации.

Оценивая работу в целом, следует отметить большой объем проведенных экспериментальных исследований и их высокий современный уровень. В целом, диссертация В.Ю. Кислицина является оригинальным и высококачественным исследованием, имеющим высокую научную и практическую значимость.

Однако, имеются **следующие замечания и недостатки:**

1). Формулировка задачи 2 (“Клонировать гены *ctr1*, *xlnR*, *clr2*, *tacA*, кодирующие факторы транскрипции целлюлаз Clr1, Clr2, XlnR, TacA”) представляется крайне неудачной. Клонирование генов само по себе не означает расшифровку нуклеотидной последовательности гена. Задача звучала бы более логичной в формулировке, например, “клонирование и анализ нуклеотидных последовательностей генов, кодирующих факторы транскрипции.....”, поскольку в данном конкретном случае речь идет об определении нуклеотидных последовательностей и их сравнении с известными последовательностями ортологичных генов из баз данных, на основании которого делается вывод о том, что данные последовательности кодируют соответствующие факторы транскрипции целлюлаз Clr1, Clr2, xlnR

и TacA). Это же замечание касается названия **раздела 5.3.1**, не в полной мере отражающего содержание проведенной работы, а также соответствующего **вывода 2**, поскольку клонирование не означает секвенирование. На основании только клонирования нельзя посчитать гомологию и делать выводы о наличии каких-либо доменов.

2). Как следует из материалов диссертации, штамм *Penicillium verruculosum* еще в 2011 году был ре-классифицирован как *Talaromyces verruculosus* (стр. 7). В диссертации нет никаких ссылок на работы по ре-классификации штамма, не приводятся данные о том, что явилось основанием для такой ре-классификации. Однако, диссертант в своей работе по-прежнему использует старое родовое и видовое название штамма, хотя уже 12 лет штамм называется по-другому. В этом случае, следовало бы использовать общепризнанное новое родовое и видовое название, а в скобках указать предыдущее название штамма: *Talaromyces verruculosus* (syn. *Penicillium verruculosum*).

3). Как отмечалось выше, в диссертации недостаточно информации об исходном штамме *Penicillium verruculosum*, из каких природных источников он был выделен и кем описан.

4). На мой взгляд, понятия “продуктивности” штаммов, а также концентрации белка используется автором довольно произвольно. В некоторых случаях при оценке продуктивности штамма автор оперирует только временем достижения максимальной концентрации секретируемого белка (не всегда указывается значение концентрации), а в других случаях, напротив, указывается только максимальная концентрация белка, без указания времени его достижения.

5). Понять, что под концентрацией белка в культуральной жидкости автор имеет ввиду концентрацию только секретируемых белков, можно только из контекста. На мой взгляд, общая концентрация белка и концентрация секретируемых белков должны быть как-то разграничены.

6). На мой взгляд, было бы целесообразно оценить влияние введенных мутаций на рост полученных штаммов гриба и выявить корреляцию биомассы и секретируемых белков целлюлолитического комплекса.

9). При описании методов допущен целый ряд погрешностей. Так, не указаны условия обработки ДНКазой I образцов РНК (стр.44), не указано, как получали суспензию мицелия для выделения РНК (стр.46).

10). В качестве Главы 1 дан список использованных сокращений, однако, он является далеко не полным. Например, в списке сокращений отсутствуют названия ключевых ферментов NiaD и других, отсутствует расшифровка аббревиатур "5'-НТП" и 5'UTR (стр. 23), т.п.н. (стр. 42). Автором используется очень большое число сокращений, при этом, не всегда при первом использовании дается полное название. Например, расшифровка СП приводится только в списке сокращений, в тексте (стр. 18) полное название отсутствует. Все это затрудняет восприятие текста диссертации.

11). Затрудняет восприятие текста также большое количество грамматических, орфографических, пунктуационных и стилистических ошибок. Например, автор пишет: Стр 48. «Полученная таким образом плазида была названа» , а как названа, не указано (предложение оборвано). Автор использует неверные термины (“выбор праймеров”, вместо “подбора праймеров” (стр.42), “центрифугирование пробирок” (стр.48), “ “... мицелий промывался центрифугированием” (стр.49), “были сравнивались” (стр.43); на рисунке 2 отсутствует обозначение В и НВ, хотя они обозначены в подписи к рисунку;

- На рисунке 25 не обозначены ось Y и не описаны элементы на графиках

- В тексте диссертации названия генов не всегда обозначены курсивом.

- “КЖ осаждалась центрифугированием...” (стр. 49, 50). Насколько я поняла из контекста, под культуральной жидкостью (КЖ) в данной работе понимается бесклеточная культуральная жидкость, то есть, КЖ получается

после осаждения клеток мицелия центрифугированием. Тогда неверно используется термин “центрифугирование КЖ”

- На стр. 65 дается отсылка к методу секвенирования, описанному в разделе 4.2.19, однако, в этом разделе метод секвенирования не описан. Это же касается использования программы ChopChop, также не упоминаемой в разделе 4.2.19.

Рисунок 21 называется: Электрофореграмма КЖ штаммов, экспрессирующих глюкозооксидазу на 4-ые сутки культивирования. М - белковый маркер. К1 – В1-2743, 1-3 – ГОКС-В1-2743, К2 – штамм В1-537, 4-6 – ГОКС-В1-537.

Во-первых, грамотнее было бы назвать рисунок “Электрофореграмма **белков** КЖ...”, и во вторых – не указано, чем дорожки 1-3 и 4-6 отличаются между собой.

Разделы 5.1.4 и 5.1.5 описывают получение *P. verruculosum* В1-221-151 с нокаутами *cbh1* и *niaD*, при этом описание того, как собственно проводился нокаут, приводится в более позднем разделе. Представляется нелогичным разделение этих разделов в диссертации.

Данные, приведенные на рисунке 22(А) расходятся с описанием результатов в тексте, по-видимому, клоны 4 и 5 перепутаны.

Вместе с тем, указанные замечания не имеют принципиального характера и не влияют на позитивную оценку диссертационного исследования в целом. Диссертация отвечает требованиям, установленным Московским государственным университетом имени М.В.Ломоносова к работам подобного рода. Содержание диссертации соответствует паспорту специальности 1.5.6. «Биотехнология», а также критериям, определенным пп. 2.1-2.5 Положения о присуждении ученых степеней в Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова, оформлена, согласно приложениям № 5, 6 Положения о диссертационном совете Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова.

Таким образом, соискатель Кислицин Валерий Юрьевич заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.6. «Биотехнология».

Официальный оппонент:

доктор биологических наук,
заведующая лабораторией микробиологической
трансформации органических соединений
Института биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г.К. Скрябина ФИЦ «Пушкинский научный центр
биологических исследований» Российской Академии наук

Донова Марина Викторовна



29.11.2023
Дата подписания

Контактные данные: тел.: +796 [REDACTED] e-mail: donova@ibpm.pushchino.ru

Специальность, по которой официальным оппонентом защищена
диссертация:

03.00.07 - микробиология

Адрес места работы:

142290, г. Пушкино Московской обл., проспект Науки, д. 5

Подпись Доновой М.В. заверяю

Ученый секретарь ИБФМ РАН им. Г.К. Скрябина – обособленного
подразделения Федерального государственного бюджетного учреждения
науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр
биологических исследований Российской академии наук»

д.б.н. Решет [REDACTED]

