

## ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Малых Е.А.

«Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза L-гистидина», представленную к защите на соискание ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 - «Генетика».

Рецензируемая работа посвящена исследованию факторов, влияющих на сверхсинтез L-гистидина (ГИС) клетками *E.coli*. В процессе выполнения работы основное внимание было уделено обеспечению клеток *E.coli* аденозинтрифосфатом (АТФ), который используется в биосинтезе ГИС не только как источник энергии, но и как субстрат ключевой реакции, а так же поиску новых мишеней регуляторного воздействия 5-аминоимдазол-4-карбоксамидрибонуклеотидом (АИКАР). Автором было показано, что побочный продукт пути биосинтеза ГИС, АИКАР, подавляет активность ключевого фермента пути биосинтеза ГИС АТФ-фосфорибозилтрансферазы. Было продемонстрировано, что снижение уровня АИКАР за счет сверхэкспрессии генов *purH* и *purA*, превращающих АИКАР в нуклеотиды аденина, положительно влияет на синтез ГИС. На следующем этапе после усиления конверсии АИКАР в нуклеотиды аденина, автор предположительно усилил синтез/регенерацию АТФ за счет введение в хромосому дополнительных копий оперонов *atp* и *tno*, кодирующих белковые комплексы,  $H^+$ -АТФ-синтазу и NDH-1, соответственно. Применение мутантного комплекса NDH-1 с измененной субстратной специфичностью привело к существенному увеличению синтеза ГИС. Так же автором было обнаружено и продемонстрировано, что инактивация гена *pitA*, кодирующего низкоаффинный транспортёр фосфатов двухвалентных металлов ( $Me^{2+}-P_i$ ), и гена *yjjK*, кодирующего трансляционный фактор EttA (ослабляющий трансляцию при снижении в клетке соотношения АТФ/АДФ), приводила к значительному увеличению синтеза ГИС на 15-22%. В настоящей работе автором впервые продемонстрирована возможность замены в клетках *E. coli* гена жизненно необходимой цитоплазматической пирофосфатазы PPase *E. coli* на ген мембранной пирофосфатазы  $H^+$ -PPase из *R. Rubrum*, участвующей в формировании протон-движущей силы, необходимой для регенерации/синтеза АТФ. Такая замена в штамме продуценте гистидина на 30% увеличила продукцию ГИС.

Работа актуальна и имеет существенное практическое значение, так как сверхсинтез L-гистидина в промышленном масштабе расширит его доступность для применения в различных областях жизнедеятельности человека - сельском хозяйстве, фармацевтической и пищевой промышленности, медицине. Кроме того, продемонстрированные подходы для увеличения АТФ могут быть использованы при конструировании продуцентов биологически активных веществ, синтез которых сопровождается высоким потреблением АТФ.



Необходимо отметить большой объем проделанной экспериментальной работы. Диссертационная работа Малых Е.А. выполнена на высоком методическом уровне, полученный экспериментальный материал интерпретируется автором корректно, выводы четко обоснованы. Основные результаты, полученные в рамках данной работы, неоднократно докладывались на конференциях и полностью отражены в публикациях.

Достоверность полученных результатов в рамках проведенных исследований, не вызывает сомнений. Выводы, сделанные автором, соответствуют поставленным целям и полученным результатам.

Данные, изложенные в автореферате, свидетельствуют о том, что представленная работа соответствует требованиям пунктов 9-14 «Положения о присуждении ученых степеней», утвержденного постановлением Правительства РФ от 24.09.2013 N 842 (ред. от 11.09.2021), предъявляемым к диссертации на соискание степени кандидата наук, а ее автор - Малых Евгения Александровна – безусловно, заслуживает присуждения искомой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Согласна на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых для процедуры защиты диссертации Малых Евгении Александровны, исходя из нормативных документов Правительства РФ, Минобрнауки РФ и ВАК при Минобрнауки РФ, в том числе на размещение их в сети Интернет на сайте ИОГен РАН, на сайте ВАК, в единой информационной системе.

Минаева Наталья Игоревна  
Научный сотрудник лаборатории №4 АО «АГРИ», к.б.н.  
Акционерное Общество «Научно-исследовательский институт Аджиномото-Генетика» (АО «АГРИ») 117545, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1, корп. 1  
Телефон: +7 (495) 780 32 66  
E-mail: [agri-ofc@agri.ru](mailto:agri-ofc@agri.ru)  
Подпись Н.И. Минаевой заверяю,

Н.И. Минаева

Генеральный директор АО «АГРИ»  
Рыбак Константин Вячеславович  
«12» сентября 2022 г.

