

ОТЗЫВ

на автореферат диссертации Малых Евгении Александровны
на тему «Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью
обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза L-гистидина»,
представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук по
специальности 1.5.7 – Генетика

Диссертационная работа Е.А. Малых посвящена получению высокопроизводительных штаммов для микробного производства L-гистидина. Эта протеиногенная аминокислота является незаменимой для человека и многих других видов животных и применяется в качестве пищевой добавки. Согласно недавним исследованиям, применение экзогенного гистидина у человека может оказывать положительный эффект при некоторых патологических состояниях, например, метаболическом синдроме или атопическом дерматите, а также увеличивать чувствительность некоторых видов раковых клеток к цитотоксическим препаратам. Экзогенный L-гистидин применяется также в сельском хозяйстве, например, для увеличения продукции молока у животных и индукции антибактериальной резистентности у культивируемых видов растений. Растущая мировая потребность в L-гистидине и его возрастающая значимость как препарата медицинского назначения делают тематику работы весьма актуальной.

Одним из наиболее современных подходов к получению L-гистидина является биотехнологический синтез с использованием генно-инженерных микроорганизмов. В литературе описаны пути направленного увеличения продукции гистидина в инженерных штаммах бактерий за счет внесения изменений на уровне активности ферментов (например, снижение чувствительности HisG к ингибиторам по типу обратной связи), регуляторных элементов генов (например, замена промотора в гене *hisD*), дубликации генов, кодирующих ферменты биосинтеза гистидина, а также внесения изменений в сопряженные метаболические пути (например, биосинтез пуринов). Работа Е.А. Малых выполнена на самом высоком экспериментальном уровне с учетом накопленного мирового опыта в данной области, исследование логически обосновано, использованные методы очень разнообразны и полностью соответствуют поставленным задачам. Автором предложены и опробованы сразу

несколько подходов к получению штамма-суперпродуцента гистидина на базе *Escherichia coli*, которые включают изменения не только непосредственно в пути биосинтеза гистидина, но и в других биосинтетических, энергетических, транспортных и регуляторных путях. Таким образом, диссертационная работа продолжает и обогащает разработку глобальной метаболической стратегии для направленного увеличения продукции гистидина и имеет значительную научную и практическую ценность.

К наиболее значимым результатам диссертационной работы, имеющим научную новизну, можно отнести следующие:

- Обнаружение ингибирующего действия 5-аминоимдазол-4-карбоксамидрибонуклеотида (АИКАР) на ключевой фермент биосинтеза L-гистидина. Этот результат представляет собой важный шаг в характеристике регуляторной сети, объединяющей компоненты биосинтеза гистидина и сопряженных метаболических путей, и открывает новые перспективы в конструировании штаммов-суперпродуцентов. В частности, уже в данной работе удаление избытка АИКАР (за счет суперэкспрессии генов *purH* и *purA*) было успешно опробовано в качестве дополнительной стратегии увеличения продукции гистидина.

- Обнаружение целого ряда клеточных факторов, которые непосредственно не входят в путь биосинтеза L-гистидина, но косвенно влияют на его продукцию, а также разработку соответствующих инженерных штаммов с мутациями этих факторов. В число таких факторов входят транспортные системы (инактивация фосфатного транспортера PitA), регуляторные (делеция белкового фактора EttA), энергетические (замена растворимой неорганической пирофосфатазы на мембранный гомолог).

Наиболее впечатляет в диссертационной работе большой объем эксперимента и комплексный характер проведенного исследования. Пул полученных результатов не только представляет значительный научный интерес для дальнейшей характеристики метаболических и регуляторных сетей в бактериальной клетке, но и создает богатую базу для практического применения. Представляется, что опробованные автором инженерные стратегии могут быть использованы в комбинации друг с другом, в этом случае относительно небольшие количественные изменения, достигнутые автором по каждому из

направлений, будут аддитивными, что суммарно приведет к более значительному росту выхода гистидина.

Исходя из положений, сформулированных в автореферате, можно заключить, что структура работы выстроена последовательно и логично. Автореферат диссертации содержит все необходимые разделы и характеризуется четкостью формулировок цели, задач и результатов. Выполненная обширная экспериментальная работа и современные методы исследования демонстрируют высокий профессиональный уровень соискателя. Судя по автореферату, автор успешно решает поставленные задачи. Достоверность и обоснованность результатов не вызывает сомнений.

Из числа недостатков автореферата хочется отметить следующее.

1. В тексте автореферата (в т.ч. на Рис. 1, где показан путь биосинтеза L-гистидина) отсутствуют структурные формулы важнейших интермедиатов, о которых идет речь, например, АИКАР. В то же время автор иногда апеллирует к структурам, например, ссылается на структурное сходство АИКАР и АМФ. На мой взгляд, идеи автора было бы удобнее воспринимать, имея под рукой основные структурные формулы.
2. На Рис. 2 приведены кривые ингибирования HisG под действием АИКАР. Во-первых, приведенные данные не демонстрируют строго конкурентный характер ингибирования, здесь он скорее смешанный. Во-вторых, из этих данных также не очевиден вывод, сделанный в тексте: «...уровень ингибирования АИКАР выше, чем АМФ», поскольку сравниваемые рисунки отличаются одновременно несколькими параметрами - и концентрациями ингибиторов, и диапазоном концентраций субстрата АТФ, и степенью ингибирования при равной концентрации АТФ. Необходимо пояснить, что именно сравнивает автор на приведенных графиках.
3. «В рамках существующей модели регуляции *rho*-регулона... нами предложена гипотеза о механизме такого влияния». – На мой взгляд, упомянув предложенную гипотезу в тексте автореферата, следовало бы не обрывать идею, а коротко, в одной фразе, написать, в чем же заключалась эта гипотеза.

Несмотря на отмеченные замечания, я считаю, что работа Е.А. Малых соответствует уровню кандидатской диссертации и обладает несомненной теоретической и практической значимостью. По теме работы получены два

патента на изобретение и опубликовано достаточное количество работ (4), в том числе одна статья - в рецензируемых журналах, рекомендованных ВАК РФ. В целом автореферат позволяет сделать вывод о том, что диссертация Е.А. Малых на тему «Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза L-гистидина» выполнена на высоком научном уровне, представляет собой самостоятельное завершённое исследование, отвечает всем 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 диссертационным исследованиям на соискание ученой степени кандидата биологических наук, а ее автор, Малых Евгения Александровна, заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

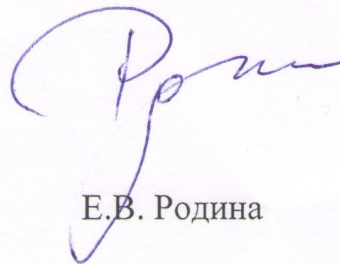
Согласна на включение в аттестационное дело и дальнейшую обработку моих персональных данных, необходимых для процедуры защиты диссертации Малых Евгении Александровны, исходя из нормативных документов Правительства РФ, Минобрнауки РФ и ВАК при Минобрнауки РФ, в том числе на размещение их в сети Интернет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

Родина Елена Валерьевна

К.х.н., доцент

кафедры химии природных соединений

химического факультета МГУ



Е.В. Родина

Химический факультет МГУ имени М.В. Ломоносова
Россия, 119991, Москва, Ленинские горы, дом 1,
строение 3, ГСП-1, МГУ, химический факультет
Тел. 8 (906) 939-5541

Подпись Е.В. Родиной заверяю,

....Ф.И.О.

«19» сентября 2022 г.

