

ОТЗЫВ официального оппонента

на диссертационную работу **Малых Евгении Александровны «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.

Актуальность темы исследования

Диссертационная работа Малых Е.А. посвящена исследованию «узких» мест метаболизма L-гистидина в клетках *Escherichia coli* и их контролю с помощью методов генной инженерии для повышения продукции этой аминокислоты.

Благодаря широкому применению L-гистидина в медицине, сельском хозяйстве, фармацевтической и пищевой промышленности, актуальным и перспективным является получение промышленных микробных продуцентов этой аминокислоты. Подобные продуценты могут повысить производство гистидина и снизить его стоимость. В качестве перспективных микробных продуцентов рассматриваются генно-модифицированные штаммы *E. coli*. Одной из точек приложения подходов метаболической инженерии штамма-продуцента гистидина может служить процесс биосинтеза АТФ, поскольку одно из промежуточных соединений – АИКАР – может быть глобальным клеточным регулятором, негативно влияющим на биосинтез гистидина. Следовательно, для дальнейшего улучшения продуцентов гистидина становится актуальным поиск мишеней регуляции АИКАР.

Структура диссертации

Диссертационная работа Малых Е.А. построена по традиционному плану и включает главы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и их обсуждение», «Заключение», «Выводы», «Список сокращений» и «Список цитируемой литературы» (300 источников). Работа изложена на 163 страницах, включая 39 рисунков и 19 таблиц. В главе «Введение» указана актуальность работы, четко сформулированы цели и задачи исследования, описаны научная новизна и практическая значимость работы, а также сформулированы положения, выносимые на защиту. В главе «Обзор литературы» даны современные представления о ключевых ферментах путей биосинтеза гистидина, а также метаболизма АТФ и неорганического пирофосфата. Показана связь между этими метаболическими путями. Кроме того, рассмотрены микробные сверхпродуценты L-гистидина. В главе «Материалы и методы» описаны использованные в работе методы, а также бактериальные штаммы и плазмиды. Материалы и методы описаны достаточно

подробно для воспроизведения результатов. В главе «Результаты и обсуждение» подробно описано обнаружение и исследование «узких» мест в метаболических процессах, связанных с биосинтезом гистидина, метаболизмом АТФ и неорганического фосфата и с использованием генно-инженерных манипуляций ключевых ферменты этих метаболических процессов. В главе «Выводы» автором сформулированы ключевые результаты исследования.

Степень достоверности результатов и обоснованности выводов, сделанных автором, а также научная новизна и практическая значимость исследования

Автором работы впервые показано, что промежуточный продукт биосинтеза АТФ – АИКАР служит ингибитором первого фермента пути биосинтеза гистидина - АТФ-фосфорибозилтрансферазы, а также ингибирует экспрессию *rho* регулона, отвечающего за потребление неорганического фосфата. В полном соответствии с этими наблюдениями сверхэкспрессия генов ферментов, превращающих АИКАР в АМФ, а также инактивация низкоаффинного переносчика фосфатов PitA повысили продукцию гистидина в новом генно-инженерном штамме. Более того, увеличение продукции гистидина может быть получено в результате сверхэкспрессии оперонов, кодирующих H⁺-АТФ-синтазу, поскольку увеличение накопления клеточной биомассы и скорости роста в этом случае свидетельствует о повышении уровня синтеза АТФ – необходимого предшественника гистидина. Впервые показано, что продукцию гистидина, а также и других аминокислот (валина и аргинина) увеличивает инактивация регулятора трансляции EttA, контролирующего синтез белка в зависимости от соотношения АДФ/АТФ. Выполненная впервые замена мембранной H⁺-пирофосфатазы *E. coli* на гетерологичный фермент из *Rhodospirillum rubrum* на 30% повысила продукцию гистидина. Итогом данной работы стало получение нового сверхпродуцента *E. coli* с более чем в 2 раза большей продукцией L-гистидина по сравнению с исходным штаммом-продуцентом, что подтверждает обнаружение «узких» мест метаболизма этой аминокислоты. Выводы работы обоснованы достаточным количеством экспериментальных данных, полученных в ходе использования современных микробиологических, молекулярно-биологических и аналитических методов.

Опубликование результатов диссертации

Результаты диссертационной работы Малых Е.А. представлены в 4 научных публикациях: в 1 статья в научном журнале, рекомендованном ВАК, в 2 патентах, 1 международной патентной заявке и 4 тезисах международных научных конференций.

Замечания к работе

К недостаткам работы можно отнести встречающиеся в тексте опечатки, синтаксические и стилистические ошибки. Есть некоторое количество англицизмов, например, оксидативный стресс (правильнее окислительный стресс). В работе не хватает рисунков-схем, отображающих генетические изменения для получения штаммов-продуцентов после EA83. При сравнении количественных показателей генно-инженерных штаммов не хватает указания результатов статистических тестов (например, *t*-test Стюдента). Однако эти недостатки ни в коей мере не снижают ценность работы.

Заключение

Диссертация Малых Е.А. «Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза L-гистидина» является логически завершенной работой, выполненной на высоком методическом уровне с использованием современных молекулярно-генетических методов; ее содержание полностью 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.

В достоверности результатов, полученных автором сомнений нет. Выводы обоснованы достаточным количеством экспериментальных данных.

Автор диссертационной работы заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Карпов Дмитрий Сергеевич

кандидат биологических наук, старший научный сотрудник,

Лаборатории регуляции внутриклеточного протеолиза

Федерального государственного бюджетного учреждения науки Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта Российской Академии наук

Адрес института: 117545, ГСП-1, г. Москва, ул. Вавилова д. 32

Тел.: +7 (499) 135-98-01

isinfo@eimb.ru

Подпись к.б.н., с.н.с. Карпова Д.С. «Заверяю»:

Ученый секретарь ИМБ РАН
Кандидат ветеринарных наук

02.08.2022



подпись

Бочаров
Александр
Анатольевич