

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 поиску и изучению новых подходов к обеспечению клеток *Escherichia coli* аденозинтрифосфатом в условиях сверхпродукции L-гистидина, а также экспериментальным проверкам данных подходов для улучшения промышленно значимых характеристик штаммов – продуцентов этой аминокислоты.

L-гистидин является протеиногенной незаменимой аминокислотой и находит всё более широкое применение в фармацевтической и пищевой промышленности, медицине и сельском хозяйстве. Общая задача совершенствования промышленных штаммов продуцентов L-гистидина, безусловно, актуальна, т.к. направлена на снижение себестоимости производства этой аминокислоты и создание возможностей увеличения объемов ее производства.

Генетическое конструирование конкурентоспособных продуцентов каждой из промышленных аминокислот, фактически, является отдельным наукоемким направлением исследований, включающим изучение различных этапов клеточного метаболизма и поиск дополнительных резервов для их улучшения, что невозможно без использования новых теоретических подходов.

Постановка задачи по изучению влияния увеличения пула АТФ в целях повышения биосинтеза L –гистидина вполне логична, поскольку биосинтез L-гистидина является АТФ-зависимым процессом. При этом, АТФ используется в биосинтезе L-гистидина не только как источник энергии, но и как субстрат первой ключевой реакции.

Результаты этих исследований могут представлять интерес и для совершенствования продуцентов других энергоемких промышленно –ценных продуктов микробного биосинтеза.

Структура диссертации

Диссертационная работа Малых Е.А. имеет традиционную структуру, характерную для подобных работ, и содержит 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» отмечена актуальность работы, сформулированы цели и задачи исследования, обозначены научная новизна и практическая значимость.

Глава «Обзор литературы» содержит три части. В первой части подробно описаны регуляция и путь биосинтеза L-гистидина в клетках энтеробактерий, а также дальнейшие перспективы использования данной аминокислоты. Во второй части кратко рассмотрена биоэнергетика бактериальной клетки и возможные пути повышения обеспеченности клеток АТФ. В третьей части описаны роль неорганического пирофосфата (PP_i) как энергетического компонента клетки; ферменты, осуществляющие его гидролиз, а также их применение. Высокий научный уровень обзора литературы свидетельствует о хорошей научной теоретической подготовке диссертанта.

Глава «Материалы и методы» содержит довольно подробную информацию об используемых в исследовании молекулярно-генетических, биохимических, микробиологических и аналитических методах. Широкий спектр использованных современных методик свидетельствует о хорошей методической подготовке диссертанта.

В главе «Результаты и обсуждение» основное место отведено результатам экспериментов по проверке эффективности различных подходов для увеличения пула АТФ в клетке с оценкой их влияния на биосинтез L-гистидина.

Среди предложенных в работе подходов для повышения пула АТФ, позитивно влияющих на биосинтез L-гистидина:

- усиление конверсии, накапливаемого в ходе биосинтеза гистидина АИКАР, в нуклеотиды аденина. Для этого осуществляли сверхэкспрессию генов *purH* и *purA*, которые участвуют в превращении АИКАР в нуклеотиды аденина;
- увеличение интегрированных в хромосому *E. coli* копий *atp* и *nuo* оперонов, кодирующих H⁺-АТФ-синтазу и NADH: убихинон-оксидоредуктазу I (NDH-1),
- замена в клетках *E. coli* гена цитоплазматической пирофосфатазы на ген мембранной пирофосфатазы *hppa*^{Rru} из *R. Rubrum*.

В ходе изучения влияния на продукцию L-гистидина усиления экспрессии гена *purA* автором было впервые обнаружено положительное влияние на продукцию L-гистидина инактивации транспортера PitA, переносящего неорганический фосфат в комплексе с двухвалентными катионами металлов (Me²⁺-Pi) в клетку и из клетки.

Следует отметить, что автору было важно не только констатировать позитивное влияние инактивации транспортера PitA на биосинтез гистидина, но и попытаться понять причину этого эффекта. Было показано, что любая экспрессия PitA негативно влияет на продукцию L-гистидина, что может быть связано с функцией этого транспортёра Me^{2+} - P_i . Проведенная оценка активности основной системы транспорта P_i в клетке, контролируемой *pho*-регулоном у продуцента L-гистидина позволили предположить, что АИКАР способен негативно влиять на индукцию *pho*-регулона, что представляет значимый теоретический интерес.

Помимо основной задачи – связанной с изучением эффектов увеличения пула АТФ в клетке, автором сделана попытка понять причину влияния на усиление биосинтеза L-гистидина ранее описанных мутаций в локусе *flr E. coli*, используя новую информацию о первичной нуклеотидной последовательности этого локуса. Было сделано предположение, что указанные мутации могут быть связаны с геном *yjjK (ettA)*, кодирующим трансляционный фактор EttA, регулирующим процесс трансляции в зависимости от соотношения АДФ/АТФ в клетке. Для экспериментального подтверждения этой гипотезы, было продемонстрировано, что делеция гена *yjjK (ettA)* положительно влияет на продукцию L-гистидина.

Опубликование результатов диссертации

Результаты и выводы 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

Существенных замечаний, влияющих на положительную оценку работы нет. В тексте встречается незначительное количество опечаток и неудачных формулировок.

Заключение

Диссертация Малых Е.А. «Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза L-гистидина» является завершённой работой, выполненной на высоком методическом и теоретическом 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, а также паспорту специальности.

Достоверность результатов, полученных автором в рамках проведенных исследований, их практическая и теоретическая ценность не вызывает сомнений. Выводы, сделанные автором, адекватны поставленным целям и полученным результатам.

Автор Малых Е.А. диссертационной работы «Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза L-гистидина» заслуживает присуждения ученой степени кандидата биологических наук по специальности 1.5.7 – генетика.

Синеокий Сергей Павлович

доктор биологических наук, профессор,

Руководитель БРЦ ВКПМ Курчатовского комплекса генетических исследований (ГосНИИгенетика) федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт».

Адрес: 123182 Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, д.1.

Факт. адрес: 117545, Россия, Москва, 1-й Дорожный проезд, д. 1

Тел.: +7 (495) 315-37-47, Факс: +7(495) 315-05-01

sineoky@genetika.ru

Синеокий Сергей Павлович

Подпись Синеокого С.П. заверяю
 Главный ученый секретарь
 НИЦ «Курчатовский институт»
 Сергунова К.А.

03.08.2022

