



ФЕДЕРАЛЬНОЕ
ГОСУДАРСТВЕННОЕ
УЧРЕЖДЕНИЕ «ФЕДЕРАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ЦЕНТР
«ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ
ОСНОВЫ БИОТЕХНОЛОГИИ»
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК»

119071, Москва, Ленинский пр-т, д. 33, стр. 2
Тел. +7 (495) 954-52-83, факс (495) 954-27-32
www.fbras.ru, info@fbras.ru

07.07.2022 № 85-01-19/529

На №

от

«Утверждаю»

Заместитель директора по
научной работе

Н.В. Равин

« 07 » июля 2022 г.



ОТЗЫВ ВЕДУЩЕЙ ОРГАНИЗАЦИИ

На диссертационную работу соискателя

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.

Диссертационная работа Малых Е.А. посвящена поиску новых подходов к обеспечению клеток *Escherichia coli* аденозинтрифосфатом в условиях сверхпродукции L-гистидина с целью расширения знаний о регуляции пути биосинтеза данной аминокислоты, а также улучшению свойств штаммов – продуцентов этой аминокислоты.

Актуальность работы

Тема работы касается улучшения свойств штаммов - продуцентов L-гистидина. В настоящее время незаменимая аминокислота L-гистидин (ГИС) находит всё более широкое применение в медицине, сельском хозяйстве, фармацевтической и пищевой промышленности. На сегодняшний день известен ряд промышленных штаммов - продуцентов ГИС на основе *Corynebacterium glutamicum*, *Serratia marcescens* и *Escherichia coli*. Промышленное получение ГИС представляет значительный практический интерес; данная аминокислота остается одной из самых дорогостоящих на мировом рынке.

Таким образом, конструирование высокопродуктивных штаммов – продуцентов ГИС является актуальной задачей, поскольку создает предпосылки для повышения рентабельности и расширения производства этой аминокислоты, способствуя снижению цены целевого продукта и, тем самым, повышению его доступности для конечных потребителей в различных отраслях промышленности.

Ключевым моментом при оптимизации характеристик рекомбинантных штаммов, уже обладающих выраженной способностью к синтезу целевого соединения, является поиск новых подходов к повышению эффективности функционирования в клетках путей биосинтеза, ведущих к формированию конечного продукта. При этом актуальность соответствующей задачи только возрастает наряду с ростом эффективности конверсии рекомбинантами субстрата в целевое вещество. Как известно, биосинтез ГИС в клетках традиционно используемой в промышленной биотехнологии бактерии *E. coli* является АТФ-зависимым процессом. При этом, АТФ используется в биосинтезе ГИС не только как источник энергии, но и как субстрат ключевой реакции. В процессе биосинтеза ГИС молекула АТФ, как нуклеотид аденина, целиком выводится из клеточного пула с образованием 5-аминоимидазол-4-карбоксамидрибонуклеотида (АИКАР). АИКАР, побочный продукт пути биосинтеза ГИС, является, в первую очередь, предшественником пуринов, а также сигналом стресса и глобальным клеточным регулятором. Поэтому, в рамках разработки новых подходов к обеспечению клеток *E. coli* аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза ГИС, поиск новых мишеней АИКАР, влияющих на биосинтез целевой аминокислоты, и обеспечение рециркуляции АИКАР в нуклеотиды аденина обладают высокой актуальностью и несомненной практической значимостью.

Структура и содержание работы

Диссертационная работа построена по общепринятому плану и содержит следующие разделы: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы», «Результаты и обсуждение», «Заключение», «Выводы» и «Список цитируемой литературы». Во введении сформулированы актуальность, цели и задачи работы, обозначены научная новизна и практическая значимость. Глава «Обзор литературы» состоит из 3 разделов. Первый раздел подробно описывает путь биосинтеза ГИС, его регуляцию в клетках энтеробактерий, применение и дальнейшие перспективы использования данной аминокислоты. Второй раздел посвящен краткому рассмотрению биоэнергетики бактериальной клетки и путей повышения обеспеченности клеток АТФ. Третий раздел посвящён описанию роли неорганического пирофосфата (PP_i), а также ферментам, осуществляющим его гидролиз, и их применению.

Глава «Материалы и методы» содержит достаточно подробное описание методов молекулярной генетики и микробиологии, применявшихся при выполнении данного исследования.

Глава «Результаты и обсуждение» состоит из 4 разделов. Первый раздел посвящен поиску новых мишеней для АИКАР и усилению превращения его в нуклеотиды аденина для повышения продукции ГИС. Во втором разделе рассматривается увеличение числа копий оперонов, кодирующих H⁺-АТФ-синтазу и NADH:убихинон-оксидоредуктазу I (NDH-1), с целью повышения уровня синтеза/регенерации АТФ, а также положительное влияние NDH-1 с измененной субстратной специфичностью на синтез ГИС. Третий раздел описывает влияние инактивации гена *yjjK (ettA)*, кодирующего трансляционный фактор

EtтА, на уровень накопления ГИС. Раздел 4 посвящен экспрессии гена мембранной H^+ -пирофосфатазы *Rhodospirillum rubrum* (H^+ -PPase^{Rru}) в клетках *E. coli*, оценке возможности её функционирования в качестве единственной пирофосфатазы, а также определению влияния экспрессии гена H^+ -PPase^{Rru} на продукцию ГИС и синтез флуоресцентного белка YFP.

Работа изложена на 163 страницах, включая 39 рисунков и 19 таблиц. Список цитируемой литературы содержит 300 источников.

Научная новизна и практическая значимость исследования

Научную новизну диссертационной работы определяют следующие результаты исследования, впервые полученные соискателем:

Показано, что у *E. coli* побочный продукт формирования ГИС, АИКАР, подавляет активность ключевого фермента пути биосинтеза целевого вещества, АТФ-фосфорибозилтрансферазы (АТФ-ФРТ). Также были получены данные, свидетельствующие о том, что АИКАР негативно влияет на индукцию *rho*-регулона, контролирующего усвоение фосфора.

Для повышения сверхсинтеза ГИС на основе ранее описанного штамма-продуцента ГИС *E. coli* KF37 был получен новый штамм, способный к увеличенному накоплению ГИС. Для этого в клетках была усилена экспрессия генов *purH* и *purA*, участвующих в превращении АИКАР в нуклеотиды аденина. Было впервые обнаружено положительное влияние на продукцию ГИС инактивации транспортера PitA, переносящего в клетку и из клетки неорганический фосфат в комплексе с двухвалентными катионами металлов (Me^{2+} - P_i).

В настоящей диссертационной работе было показано, что увеличение в хромосоме *E. coli* числа копий *atp* и *nuo* оперонов, кодирующих H^+ -АТФ-синтазу и NADH:убихинон-оксидоредуктазу I, соответственно, может стимулировать накопление биомассы и/или скорость роста культуры как при высокой, так и при низкой аэрации.

Были сконструированы штаммы *E. coli*, содержащие мутацию *nuoF*^{E183A}, придающую NDH-1 способность окислять как NADH, так и NADPH, что, в свою очередь, позволяет задействовать в процессе образования протон-движущей силы, необходимой для регенерации АТФ, избыточный NADPH, образующийся при синтезе целевого соединения. Показано, что эта мутация повышает продукцию ГИС штаммом-продуцентом.

В ходе поиска новых подходов к обеспечению клеток *E. coli* аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза ГИС, была впервые продемонстрирована возможность замены в клетках *E. coli* гена *ppa*, жизненно необходимой цитоплазматической пирофосфатазы, на ген мембранной пирофосфатазы *hppa*^{Rru} из *R. rubrum*. Такая замена в штамме-продуценте

ГИС приводила к увеличению накопления целевой аминокислоты. Более того, было дополнительно продемонстрировано положительное влияние экспрессии гена, кодирующего H^+ -PPase^{Rtu}, на синтез белка на примере флуоресцентного репортера YFP.

Однако, несмотря на высокий научный и методический уровень, работа не лишена определенных недостатков.

Прежде всего, утверждение автора о том, что в сконструированных рекомбинантных штаммах-продуцентах ГИС подавляется экспрессия генов *pho*-регулона, по-видимому, следовало бы подкреплять данными о контроле экспрессии всех генов соответствующего регулона, а не только данными об активности щелочной фосфатазы PhoA, а также результатами транскриптомного анализа. Более того, автор предполагает, что именно повышение внутриклеточного пула АИКАР в сконструированных продуцентах ГИС подавляет экспрессию генов *pho*-регулона за счет снижения способности к автофосфорилированию мембранно-ассоциированной сенсорной киназы PhoR, входящей в состав двух-компонентной системы передачи сигнала PhoBR, контролирующей экспрессию генов данного регулона. Однако механизм такого подавления остаётся не до конца ясным.

В своей работе диссертант неоднократно делает акцент на необходимости снабжения клетки достаточным для сверхсинтеза ГИС количеством АТФ, уделяя, разумеется, внимание активности электрон-транспортной цепи, обеспечивающей клетку энергией за счет окислительного фосфорилирования. С целью интенсификации процесса регенерации АТФ соискателем предпринята попытка оверэкспрессии генов *atp*-оперона, кодирующих компоненты АТФ-синтазного комплекса. Однако, оверэкспрессия соответствующих генов, сама по себе, не способна обеспечить клетку повышенной генерацией энергии в отсутствие интенсивного протекания реакций окислительного цикла трикарбоновых кислот. Соответствующий цикл, потребляющий в качестве субстратов ацетил-КоА и щавелевоуксусную кислоту, являющиеся не только прямыми производными терминальных продуктов гликолиза, но и ключевыми предшественниками в синтезе ряда аминокислот, очевидно, сопрягает генерацию энергии с непродуктивным расходом субстрата, снижая выход целевого продукта. Работа выиграла бы от прямой оценки диссертантом вклада окислительного ЦТК в эффективность синтеза сконструированными штаммами ГИС.

В данной связи, хотелось бы обратить внимание автора на то, что представленные в работе данные не позволяют однозначно оценить достаточность или избыточность для синтеза целевого соединения генно-инженерных манипуляций, предпринятых для

усиления экспрессии генов *atp*-оперона. Прояснению данного момента могла бы способствовать прямая оценка уровней экспрессии соответствующих генов, в совокупности с анализом изменений показателей выхода или накопления рекомбинантами целевого вещества, при сравнительной характеристике штаммов, экспрессирующих указанные гены под контролем различных промоторов.

Кроме того, с учетом глобального эффекта использованных в настоящей работе генетических модификаций на функционирование всего биохимического аппарата клетки, автору, возможно, следовало бы оценивать их вклад в перестройку клеточного метаболизма системным образом. Учитывая, в том числе, вклад в генерацию клеткой энергии не только процессов окислительного, но и субстратного фосфорилирования, протекающих в сопряжении с гликолизом, а также уделяя внимание особенностям функционирования пентозо-фосфатного цикла, вовлеченного в NADH/NADPH-зависимое формирование предшественников, необходимых для синтеза целевого соединения, ГИС.

Высказанные замечания не являются принципиальными, в основном носят дискуссионный характер и не снижают общей высокой оценки работы.

Заключение

Диссертационная работа Малых Е.А. «Генетическая модификация клеток *Escherichia coli* с целью обеспечения их аденозинтрифосфатом в условиях сверхсинтеза L-гистидина» является 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.

Достоверность результатов, полученных автором в рамках проведенных исследований, не вызывает сомнений. Выводы, сделанные автором, адекватны поставленным целям и полученным результатам. По теме диссертации опубликовано 4 печатные работы, из них 1 в журнале, рекомендованном ВАК, 2 патента, 1 патентная заявка. Материалы диссертации были представлены на VIII Российском Симпозиуме «Белки и пептиды», 18–22 сентября 2017, Москва, Россия; на 5-ой Конференции по прикладной системной биологии, 2-5 ноября 2020. Делфт, Нидерланды (OnLine); на Международной конференции «Метаболическая инженерия 14», July 11-15 июля, 2021. Гонолулу, США (OnLine).

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

Отзыв на диссертационную работу Малых Е.А. подготовлен кандидатом химических наук, руководителем группы метаболической инженерии бактерий А.Ю. Гулевичем. Отзыв обсужден и одобрен на межлабораторном семинаре ФИЦ Биотехнологии РАН 23 июня 2022 г. (Протокол №1).

А.Ю. Гулевич

Подпись Гулевича А.Ю. завершено:

Начальник отдела кадров
Е.Г. Шелевер

07.07.2022

